

---

# Ingeniería Tissular del hueso y el cartílago empleando células mesenquimales estromales y biomateriales

Clara Sanjurjo Rodríguez

---

Tesis doctoral UDC / 2016

**Directores:** Francisco Javier Blanco García y Silvia María Díaz  
Prado

Tutora: Silvia María Díaz Prado

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

Memoria presentada para optar al grado de doctor internacional



**Dr. Francisco Javier Blanco García**, Director Científico del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y **Dra. Silvia María Díaz Prado**, profesora del Área de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Medicina de la Universidad de A Coruña.

CERTIFICAN:

Que Dña. **Clara Sanjurjo Rodríguez**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo **“Ingeniería Tisular del hueso y el cartílago empleando células mesenquimales estromales y biomateriales”**.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de doctor internacional en Ciencias de la Salud.

Dr. Francisco Javier Blanco García

Dra. Silvia María Díaz Prado

En A Coruña, 12 de Mayo de 2016







Parte de la investigación incluida en esta tesis ha sido realizada bajo la supervisión del Dr. Ángel Raya Chamorro, líder del grupo *Stem Cell Pluripotency* del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) y director científico del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CRMB), durante una estancia de investigación predoctoral en el año 2014.





**NIHR**  
**Leeds Musculoskeletal**  
**Biomedical Research Unit**

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, se realizó una estancia de investigación predoctoral, en el curso académico 2013/2014, en el *Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine* (LIRMM) bajo la supervisión de la Dra. Elena Jones, profesora adjunta y líder del grupo *Stem Cells* del LIRMM, y la Dra. Jehan El-Jawhari.

La investigación realizada durante esta estancia predoctoral no se ha podido incluir dentro del presente trabajo por motivos de propiedad intelectual.



*A mi familia, mis amigos y a Pablo*



En primer lugar, mi agradecimiento a todos los donantes porque su altruismo ha permitido que este trabajo se llevara a cabo.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Francisco J. Blanco García y a la Dra. Silvia M. Díaz Prado por darme la oportunidad de realizar este trabajo, dentro de la unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (TCMR) del grupo de Reumatología del INIBIC, y por guiarme durante todo el proceso.

Agradezco a los Drs. Isaac Fuentes Boquete, Rosa Meijide Failde y Dr. Francisco J. de Toro Santos por todo su apoyo.

A la Universidad de A Coruña, la Fundación Profesor Novoa Santos, la Diputación de A Coruña, la red CIBER-BBN y a la Fundación Española de Reumatología (de la Sociedad Española de Reumatología), quisiera agradecer el haberme financiado como investigadora y como beneficiaria de estancias durante mi tesis.

Gracias a todos los compañeros (a los que están y a los que se fueron) de todos los grupos del INIBIC, por hacerme parte de esta gran familia. A los compañeros de Oncología, Inflamación, Endocrinología, CellCom... A mis compañeros de Reumatología que siempre han buscado un hueco para resolver cualquier duda: Dr. Ignacio Rego, Dr. Ángel Soto, Dra. Carolina Fernández, Dra. Beatriz Rocha, Dra. Lucía Lourido, Dra. Valentina Calamia, Dra. Elena Burguera... A Helvia Martínez por embarcarse conmigo en esta aventura. A la Dra. Emma Muños por ser una gran maestra. A la Dra. Mercedes Fernández por su inagotable paciencia y su disposición para colorearme cualquier pregunta (hasta las más tontas). A mis compañeras de borrascas y anticiclones Sara Relaño, Estefa Cortés y María Eugenia Vázquez por su gran ayuda y por hacer más amenos y didácticos los descansos. En especial quisiera agradecer a la Dra. Tamara Hermida por todas las collejas y enseñanzas que la hacen ser más que una compañera, una amiga. A la Dra. Ángela Vela por su increíble fuerza y alegría que contagia. A Rocío Castro por ser una gran compañera de meteduras de pata que juntas intentamos resolver. A María José Sánchez por ser una gran maestra y por su gran paciencia. A Adrián Varela por su alegría y sentido del

humor. A Olalla Ramil por estar siempre ahí y ser la mejor amiga. A mis “niños” Inés Seijo, Tania Fernández, María Souto, Antonio Compañ... por su temeridad al dejarme hacer de guía.

También, quisiera agradecer el trabajo y el apoyo de los técnicos de la Plataforma de Histomorfología del INIBIC, Purificación Filgueira y Noa Goyanes. A las Dras. de la unidad de microscopía del SAI, Ada Castro y Catalina Sueiro, por su apoyo y sus enseñanzas. A los grandes profesionales: Estefanía Cives, Emma Rodríguez, Pilar Cal, Natalia Cal, Dra. Natividad Oreiro y Alfredo Rodríguez, por toda la ayuda recibida durante estos años.

Quisiera agradecer a la Dra. Elena Jones, a la Dra. Jehan El-Jawhari, al Dr. Dennis McGonagle, al Dr. Peter Giannoudis y a los demás miembros del grupo *Stem Cells*, del *Leeds Institute of Musculoskeletal and Rheumatic diseases*, por su acogida durante mi estancia.

También quisiera agradecer al Dr. Ángel Raya, a Yvonne Richaud y a los demás miembros del grupo *Stem Cell Pluripotency*, y a los del grupo *Neural Commitment and Differentiation*, del Instituto de Bioingeniería de Cataluña, por su recibimiento durante mi estancia, por todo lo que me enseñaron y por su paciencia.

Agradezco a Bruna Parma de Opocrin S.p.A. el suministro de los biomateriales de Col; a V. Seoane y J.M. Cruz de ICIRO por suministrar los soportes de bFTC; a Pedro Esbrit (Fundación Jiménez Díaz) por suministrar la *PTHrP*; Julia Buján y Natalio García del Departamento de Especialidades Médicas de la Universidad de Alcalá de Henares por compartir sus conocimientos en Histología; UCEX del CHUAC por suministrar las muestras ovinas; y a Ángel Raya por la cesión de las células mesenquimales derivadas de *iPS*.

Por último, aunque no menos importante, quisiera agradecer a mi familia, sobre todo a mis padres por el esfuerzo que han realizado durante todos estos años y por su apoyo. A Pablo, por aguantarme tantos años, por su



paciencia infinita y por ser el que le da equilibrio y sentido a mi vida. A mis amigos, en especial a mis tres mosqueteras Sara, Diana y Oly que, a pesar de los años, seguimos batallando juntas.

Los estudios incluidos en esta tesis pudieron llevarse a cabo gracias al apoyo financiero de las siguientes instituciones y organismos:

- Universidade da Coruña
- Cátedra Bioiberica de Universidade da Coruña
- INIBIC, Servizo Galego de Saúde
- Instituto de Salud Carlos III - CIBER BBN CB06-01-0040
- Comunidad Autónoma de Madrid (S2009/MAT-1472)
- REDICENT (*Rede de Investigación en Células Nai e Terapia Celular*)
- Diputación da Coruña
- Fundación Profesor Novoa Santos
- Instituto Coruñés de implantología oral (ICIRO)
- Xunta de Galicia (CN2012/142, R2014/050 y GPC2014/048)
- Fundación Española de Reumatología (FER2014)
- Ministerio de Ciencia e Innovación PLE2009-0144
- Fondo de Investigación Sanitaria-PI 08/2008 con la participación de fondos del FEDER (Comunidad Europea)
- Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

*GRACIAS!!!*







LISTADO DE ABREVIATURAS .....	XXI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XXXIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XLIII
RESUMEN .....	XLVII
RESUMO .....	LI
ABSTRACT .....	LV
<u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</u> .....	1
<b>1.1. Clasificación estructural de las articulaciones.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Articulación sinovial .....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Estructura de la articulación sinovial .....	4
<b>1.3. Cartílago articular .....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Componente celular del cartílago articular .....	7
1.3.2. Matriz extracelular del cartílago articular .....	7
1.3.3. Estructura histológica del cartílago articular .....	9
<b>1.4. El hueso subcondral.....</b>	<b>10</b>
1.4.1. Fase orgánica del tejido óseo.....	11
1.4.1.1. <i>Componente celular del tejido óseo</i> .....	11
1.4.1.2. <i>Matriz extracelular del tejido óseo</i> .....	12
1.4.2. Fase mineral inorgánica del tejido óseo.....	12
<b>1.5. Unidad funcional osteocondral.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6. La artrosis .....</b>	<b>13</b>
<b>1.7. Tratamientos para lesiones focales.....</b>	<b>15</b>
1.7.1. Técnicas de estimulación de la médula ósea.....	16
1.7.2. Autotrasplante de condrocitos autólogos.....	17
1.7.3. Mosaicoplastia .....	18
1.7.4. Desarrollo de sustitutos tisulares .....	19
<b>1.8. Ingeniería tisular .....</b>	<b>19</b>
1.8.1. Tipo celular.....	19

1.8.1.1. <i>Condrocitos y osteoblastos</i> .....	19
1.8.1.2. <i>Células mesenquimales estromales</i> .....	19
1.8.1.3. <i>Células pluripotentes inducidas</i> .....	21
1.8.2. Factores bioactivos .....	23
1.8.3. Soportes o biomateriales .....	24
1.8.3.1. <i>Propiedades de los soportes</i> .....	24
1.8.3.2. <i>Composición de los soportes</i> .....	25
1.8.3.3. <i>Biomateriales de colágeno</i> .....	25
1.9. Modelos de reparación osteocondrales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	26
1.9.1. Modelos de reparación de cartílago articular <i>in vitro</i> .....	26
1.9.2. Modelos de reparación osteocondral <i>in vivo</i> : el modelo ovino .....	27
1.9.3. Escalas de evaluación histológica de la reparación osteocondral .....	28
<u>CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u> .....	31
<u>CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS</u> .....	35
3.1. Aislamiento y cultivo celular .....	37
3.1.1. Aislamiento y cultivo de células procedentes de la médula ósea humana .....	37
3.1.2. Aislamiento y cultivo de células procedentes de la médula ósea ovina .....	38
3.1.3. Aislamiento y cultivo de células derivadas de células pluripotentes inducidas .....	39
3.2. Caracterización celular .....	41
3.2.1. Caracterización de las células procedentes de médula ósea humana y ovina .....	41
3.2.1.1. <i>Análisis de la expresión de marcadores de superficie en células procedentes de médula ósea humana y ovina</i> .....	41
3.2.1.2. <i>Capacidad de diferenciación multipotente in vitro de las células procedentes de médula ósea humana y ovina...</i>	43

3.2.2. Caracterización de las células derivadas de células pluripotentes inducidas .....	46
3.2.2.1. <i>Análisis de la expresión de marcadores de superficie en las células derivadas de células pluripotentes inducidas</i> .....	47
3.2.2.2. <i>Capacidad de diferenciación multipotente in vitro de las células derivadas de células pluripotentes inducidas....</i>	47
3.3. Siembra y cultivo de las células mesenquimales estromales sobre biomateriales .....	49
3.3.1. Características de los soportes.....	49
3.3.2. Diferenciación condrogénica de células mesenquimales estromales humanas sobre biomateriales de colágeno I y heparán sulfato .....	51
3.3.3. Diferenciación condrogénica de células mesenquimales estromales humanas sobre biomateriales de colágeno y glicosaminoglicanos .....	51
3.3.4. Diferenciación osteogénica de células mesenquimales estromales ovinas sobre soportes de colágeno I y $\beta$ fosfato tricálcico .....	52
3.4. Desarrollo de modelos <i>in vitro</i> de lesión de cartílago articular humano y ovino .....	52
3.4.1. Obtención del cartílago articular humano y ovino .....	52
3.4.2. Generación de la lesión focal en el cartílago .....	54
3.4.3. Siembra de las células mesenquimales estromales humanas y ovinas sobre los biomateriales de colágeno .....	54
3.4.4. Cultivo de las células mesenquimales estromales humanas sobre los biomateriales en la lesión de cartílago articular humano.....	54
3.4.5. Cultivo de las células mesenquimales estromales ovinas sobre los biomateriales en la lesión de cartílago articular ovino.....	55
3.5. Análisis de la capacidad de diferenciación de las células sobre los soportes y de la reparación en los modelos de lesión <i>in vitro</i> .....	55
3.5.1. Análisis histológico de los constructos, osteogénicos y condrogénicos, y de los modelos de lesión <i>in vitro</i> .....	55

3.5.2. Análisis inmunohistoquímico de los constructos, osteogénicos y condrogénicos, y de los modelos de lesión <i>in vitro</i> .....	56
3.5.3. Evaluación de la reparación en los modelos de lesión <i>in vitro</i> .....	57
3.5.4. Análisis ultraestructural y morfométrico de los constructos osteogénicos y condrogénicos .....	57
3.5.5. Estudio de los constructos osteogénicos de colágeno I mediante energía dispersiva de rayos x.....	58
3.5.6. Estudios moleculares de los constructos condrogénicos y de las diferenciaciones celulares.....	58
3.5.7. Análisis de liberación de colágeno al medio de cultivo por parte de los constructos condrogénicos .....	60
3.6. Análisis estadístico.....	60
<u>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</u> .....	61
4.1. Caracterización celular .....	63
4.1.1. Caracterización de las células aisladas de médula ósea humana.....	63
4.1.1.1. <i>Expresión de marcadores de superficie en las células aisladas de médula ósea humana</i> .....	63
4.1.1.2. <i>Diferenciación adipogénica de las células aisladas de médula ósea humana</i> .....	64
4.1.1.3. <i>Diferenciación osteogénica de las células aisladas de médula ósea humana</i> .....	65
4.1.1.4. <i>Diferenciación condrogénica de las células aisladas de médula ósea humana</i> .....	66
4.1.2. Caracterización de las células aisladas de médula ósea ovina .....	67
4.1.2.1. <i>Expresión de marcadores de superficie en las células aisladas de médula ósea ovina</i> .....	67
4.1.2.2. <i>Diferenciación adipogénica de las células aisladas de médula ósea ovina</i> .....	68
4.1.2.3. <i>Diferenciación osteogénica de las células aisladas de médula ósea ovina</i> .....	70
4.1.2.4. <i>Diferenciación condrogénica de las células aisladas de médula ósea ovina</i> .....	71



4.1.3. Caracterización de las células derivadas de células pluripotentes inducidas .....	73
4.1.3.1. <i>Expresión de marcadores de superficie en las células derivadas de células pluripotentes inducidas</i> .....	73
4.1.3.2. <i>Diferenciación adipogénica de las células derivadas de células pluripotentes inducidas</i> .....	74
4.1.3.3. <i>Diferenciación osteogénica de las células derivadas de células pluripotentes inducidas</i> .....	75
4.1.3.4. <i>Diferenciación condrogénica de las células derivadas de células pluripotentes inducidas</i> .....	76
4.2. Evaluación de los constructos condrogénicos humanos.....	77
4.2.1. Evaluación de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato .....	77
4.2.1.1. <i>Análisis celular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato</i> .....	77
4.2.1.2. <i>Análisis de la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato</i> .....	81
4.2.1.3. <i>Análisis morfométrico de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato</i> .....	87
4.2.1.4. <i>Análisis ultraestructural de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato</i> .....	89
4.2.2. Evaluación de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos.....	90
4.2.2.1. <i>Análisis celular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos</i> .....	90
4.2.2.2. <i>Análisis de la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos</i> .....	93
4.2.2.3. <i>Análisis morfométrico de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos</i> .....	97
4.2.2.4. <i>Análisis ultraestructural de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos</i> .....	98
4.3. Evaluación de los constructos osteogénicos ovinos .....	100

4.3.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los constructos osteogénicos de colágeno y los de $\beta$ fosfato tricálcico.....	100
4.3.2. Análisis morfométrico de las células y la matriz extracelular de los constructos osteogénicos de colágeno y los de $\beta$ fosfato tricálcico.....	100
4.3.3. Análisis ultraestructural de las células y la matriz extracelular de los constructos osteogénicos de colágeno y los de $\beta$ fosfato tricálcico.....	102
4.3.4. Estudio de los constructos osteogénicos de colágeno I mediante energía dispersiva de rayos x.....	104
4.4. Evaluación de la reparación en los modelos de lesión.....	105
4.4.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico del modelo de reparación <i>in vitro</i> de cartílago articular humano .....	105
4.4.2. Análisis histológico e inmunohistoquímico del modelo de reparación <i>in vitro</i> de cartílago articular ovino.....	110
<u>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN</u> .....	113
<u>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</u> .....	137
<u>CONCLUSIONS</u> .....	141
<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	145
ANEXOS	
<b>Anexo I-</b> Hoja de información al paciente y consentimiento informado.....	173
<b>Anexo II-</b> Aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal .....	181
<b>Anexo III-</b> Tablas resumen de los resultados histológicos e inmunohistoquímicos obtenidos en los constructos.....	185
<b>Anexo IV-</b> Justificantes de las estancias realizadas.....	189
<b>Anexo V-</b> Difusión de los resultados obtenidos.....	197

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---



**%:** Porcentaje.

**<:** “Menor que”.

**>:** “Mayor que”.

**≤:** “Menor o igual que”.

**±:** Más/menos.

**°C:** Grados centígrados.

**α-MEM:** *Minimum Essential Medium Eagle α modification*, medio mínimo esencial de *Eagle* con modificación α.

**β-FTC:** β-fosfato tricálcico.

**μg:** Microgramo.

**μl:** Microlitro.

**μm:** Micrómetros.

**μM:** Micromolar.

**AA:** L-ácido ascórbico.

**Ac:** Anticuerpo.

**ACI:** *Autologous Chondrocyte Implantation*, implantación de condrocitos autólogos.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**ADPN:** Adiponectina.

**Agg:** *Aggrecan*, Agrecano.

**AH:** Ácido hialurónico.

**AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos.

**ALP:** *Alkaline phosphatase*, fosfatasa alcalina.

**AMIC:** *Autologous matrix induced chondrogenesis*, condrogénesis autóloga inducida por matriz.

**APC:** *Allophycocyanin*, alofococianina.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ASB:** Albúmina de suero bovino.

**bFGF:** *Basic fibroblast growth factor*, factor de crecimiento fibroblástico básico.

**BMPs:** *Bone morphogenetic proteins*, proteínas morfogénéticas óseas.

**BMP2:** *Bone morphogenetic protein 2*, proteína morfogénetica ósea 2.

**BMP4:** *Bone morphogenetic protein 4*, proteína morfogénetica ósea 4.

**BMP6:** *Bone morphogenetic protein 6*, proteína morfogénetica ósea 6.

**BMP7:** *Bone morphogenetic protein 7*, proteína morfogénetica ósea 7.

**C:** Carbono.

**Ca:** Calcio.

**CAEIG:** Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia.

**C-CSMEs:** Células pseudo-clonales similares a células mesenquimales estromales.

**CD:** Complejo de diferenciación.

**CD29:**  $\beta$ 1-integrina.

**CD34:** *HPCA1, hematopoietic progenitor cell antigen 1*; antígeno 1 de la célula progenitora hematopoyética.

**CD44:** *H-CAM, homing cell adhesion molecule*; molécula de adhesión asociada a la migración celular.

**CD45:** *LCA, leukocyte common antigen*; antígeno leucocitario común.

**CD69:** Antígeno de activación temprana.

**CD73:** Ecto-5-nucleotidasa, SH3 ó SH4.

**CD90:** *Thy-1, thymocyte differentiation antigen-1*; antígeno de diferenciación de los timocitos -1.

**CD105:** Endoglina ó SH2.

**CD106:** *VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule 1*; molécula de adhesión celular vascular 1.

**CD166:** *ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule*; molécula de adhesión celular activadora de leucocitos.

**CD271:** *NGFR, nerve growth factor receptor*; receptor del factor de crecimiento nervioso.

**CHS:** *Chondroitin sulfate*, condroitín sulfato.

**CHUAC:** *Complexo Hospitalario Universitario da Coruña*.

**cm<sup>2</sup>:** Centímetro cuadrado.

**CMEs:** Células mesenquimales estromales.

**CMEs-MO:** Células mesenquimales estromales de médula ósea.

**CMEs-TA:** Células mesenquimales estromales de tejido adiposo.

**c-myc:** *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*, oncogén viral homólogo de mielocitomatosis aviar v-myc.

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono.

**col.:** Colaboradores.

**Col:** Colágeno.

**Col I / COL1:** Colágeno de tipo I.

**Col II / COL2:** Colágeno de tipo II.

**Col III:** Colágeno de tipo III.

**Col V:** Colágeno de tipo V.

**Col VI:** Colágeno de tipo VI.

**Col IX:** Colágeno de tipo IX.

**Col X:** Colágeno de tipo X.

**Col XI:** Colágeno de tipo XI.

**CSMEs:** Células similares a células mesenquimales estromales.

**Cu:** Cobre.

**DAB:** 3,3'- diaminobencidina.

**Dex:** Dexametasona.

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, medio de *Eagle* con modificación de *Dulbecco*.

**DMEM5%:** Medio *DMEM* con un 5% de suero bovino fetal y con 1% de penicilina/estreptomicina.

**DMEM20%:** Medio *DMEM* con un 20% de suero bovino fetal y con 1% de penicilina/estreptomicina.

**DMOAD:** *Disease Modifying Osteoarthritis Drugs*, fármacos modificadores de la enfermedad artrósica.

**DSC:** *Differential scanning calorimetry*, calorimetría de barrido diferencial.

**EBs:** *Embryoid bodies*, cuerpos embrionarios.

**EDTA:** *Ethylene diamine tetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetraacético.

**EDX:** Energía dispersiva de rayos X.

**E.E.:** Error estándar.

**ESCs:** *Embryonic stem cells*, células madre embrionarias.



**FABP4:** *Fatty acid binding protein 4*, proteína de unión a ácidos grasos 4.

**FACS:** *Fluorescence Activated Cell Sorting*, tampón de fluorescencia de clasificación de células activadas.

**FAMEs:** Fármacos modificadores de la enfermedad artrósica.

**FITC:** *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína.

**GAGs:** Glicosaminoglicanos.

**Glx:** *Glutamax<sup>TM</sup>*.

**h:** Hora.

**HA:** Hidroxiapatita.

**HAPLN1:** *Hyaluronic acid and proteoglycan protein link 1*, proteína 1 de unión a ácido hialurónico y proteoglicanos.

**H-E:** Hematoxilina-eosina.

**HS:** Heparán sulfato.

**IBEC:** Instituto de Bioingeniería de Cataluña.

**ICIRO:** Instituto Coruñés de Implantología y Rehabilitación Oral.

**IGF:** *Insuline-like growth factor*, factor de crecimiento insulínico.

**IL1 $\beta$ :** Interleuquina 1 $\beta$ .

**INIBIC:** Instituto de Investigación Biomédica da Coruña.

**iPS:** *Induced pluripotent stem cells*, células pluripotentes inducidas.

**ISCT:** *International Society for Cell Therapy*, Sociedad Internacional de Terapia Celular.

**IT:** Ingeniería tisular.

**ITS:** *Insuline-transferrin-selenous acid premix*, combinación insulina-transferrina- selenio.

**Klf4:** *Kruppel-like factor 4*, factor similar a *Kruppel 4*.

**KO-DMEM:** *KnockOut-Dulbecco's modified Eagle medium*, medio de *Dulbecco* modificado de *Eagle* de *knockout*.

**KO-SR:** Suero *knockout*.

**LPL:** Lipoproteína lipasa.

**MACT:** *Matrix associated chondrocyte transplantation*, trasplante de condrocitos asociado a matriz.

**MEB:** Microscopía electrónica de barrido.

**mEBs:** Medio para cuerpos embrionarios.

**MEC:** Matriz extracelular.

**mESCs:** Medio para células madre embrionarias.

**MET:** Microscopía electrónica de transmisión.

**min:** Minuto.

**ml:** Mililitro.

**mm:** Milímetro.

**mM:** Milimolar.

**MMP13:** *Matrix metaloprotease 13*, metaloproteasa de matriz 13.

**MO:** Médula ósea.

**MSTs:** *Marrow-stimulating techniques*, técnicas de estimulación de médula ósea.

**NC-CSMEs:** Células no clonales similares a células mesenquimales estromales.

**NEAA:** *Non-essential amino acids*, aminoácidos no esenciales.

**NRE:** Niveles relativos de expresión.

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno.

**OA:** *Osteoarthritis*, artrosis.

**OARSI:** *Osteoarthritis Research Society International*, Sociedad Internacional de Investigación en artrosis.

**oCMEs:** Células mesenquimales estromales ovinas.

**oCMEs-MO:** Células mesenquimales estromales de médula ósea ovina.

**Oct4:** *Octamer-binding transcription factor 4*, factor de transcripción de unión a octámeros 4.

**OP:** Osteopontina.

**OsO<sub>4</sub>:** Tetraóxido de osmio.

**P:** Fósforo.

**PBS:** *Phosphate buffered saline*, tampón fosfato salino.

**PCL:** Policaprolactona.

**PCNA:** *Proliferating cell nuclear antigen*, antígeno nuclear de proliferación celular.

**PCR:** *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

**P/E:** Penicilina/estreptomicina.

**PE:** *Phycoerythrin*, ficoeritrina.

**PECy5:** *Phycoerythrin with cyanin-5*, ficoeritrina con cianina 5.

**PEG:** Polietilenglicol.

**PGA:** *Polyglycolic acid*, ácido poliglicólico.

**PGs:** Proteoglicanos.

**pH:** Potencial de hidrogeniones.

**PLA:** *Polylactic acid*, ácido poliláctico.

**PLGA:** *Poly lactic-co-glycolic acid*, ácido poli láctico-co-glicólico.

**PPAR $\gamma$ :** *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas.

**PTHrP:** *Parathyroid hormone-related protein*, proteína relacionada con la hormona paratiroidea.

**qRT-PCR:** *Quantitative real time polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.

**RT-PCR:** *Reverse transcription polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscripción.

**s:** Segundo.

**SAI:** *Servizo de Apoio á Investigación*, Servicio de Apoyo a la Investigación.

**SBF:** Suero bovino fetal.

**SO:** Safranina O.

**SOX2:** *Sex determining region Y-box 2*, región determinante del sexo del cromosoma Y-caja 2.

**SOX9:** *Sex determining region Y-box 9*, región determinante del sexo del cromosoma Y-caja 9.

**Sp7:** Osterix.

**SSEA-4:** *Stage specific embryonic antigen-4*, antígeno específico embrionario 4.

**STRO-1:** Antígeno estromal 1.

**SYSADOA:** *Symptomatic slow action drugs for OA*, fármacos sintomáticos de acción lenta para la artrosis.

**TBP:** *TATA binding protein*, proteína de unión a caja TATA.

**TC:** Terapia Celular.

**TGF $\beta$** : *Transforming growth factor  $\beta$* , factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

**TGF $\beta$ 1**: *Transforming growth factor  $\beta$  1*, factor de crecimiento transformante  $\beta$  1.

**TGF $\beta$ 3**: *Transforming growth factor  $\beta$  3*, factor de crecimiento transformante  $\beta$  3.

**TM**: Tricrómico de *Masson*.

**T<sub>onset</sub>**: El punto de intersección entre la línea de base y la sección lineal de la curva endotérmica ascendente.

**UDC**: *Universidade da Coruña*, Universidad de A Coruña.

**VEGF**: *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial vascular.

**VIM**: Vimentina.

**VK**: *Von Kossa*.

**WNT3a**: Miembro 3a de la familia *WNT*.

**xg**: Fuerza centrífuga relativa.

**Zn**: Zinc.



## ÍNDICE DE FIGURAS





<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de los elementos básicos que componen la articulación sinovial. Modificada de la web <a href="https://quizlet.com/60157233/joints-part-2-synovial-joint-flash-cards/">https://quizlet.com/60157233/joints-part-2-synovial-joint-flash-cards/</a> .....	4
<b>Figura 2.</b> Imagen de microscopía electrónica A) de barrido (MEB) y B) de transmisión (MET), en las que se observa una laguna condrocitaria. Imágenes modificadas de Poole y col. (1987) .....	7
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la estructura de los agregados de agregano (Agg). Imagen modificada de la web: <a href="http://www.seleccionesveterinarias.com/es/articulos/traumatologia-veterinaria/condroprotectores-en-el-manejo-de-la-osteoartritis-de-perros-y-gatos">http://www.seleccionesveterinarias.com/es/articulos/traumatologia-veterinaria/condroprotectores-en-el-manejo-de-la-osteoartritis-de-perros-y-gatos</a> .....	8
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la estructura de la unidad osteocondral. Modificada de Madry y col. (2010).....	10
<b>Figura 5.</b> A) Representación esquemática de la localización de los tipos celulares presentes en el hueso (imagen modificada de la web <a href="http://periodoncia5toc.blogspot.com.es/2010/12/hueso-alveolar.html">http://periodoncia5toc.blogspot.com.es/2010/12/hueso-alveolar.html</a> ). B) Imágenes de MET de un soporte compuesto de HA pura (modificadas de Huber y col., 2006) .....	12
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática comparativa de la anatomía de una articulación normal y una articulación artrósica (imagen modificada de: <a href="https://www.zoetisus.com/products/pages/rimadyl/vdm/osteoarthritis.aspx">https://www.zoetisus.com/products/pages/rimadyl/vdm/osteoarthritis.aspx</a> ) .....	15
<b>Figura 7.</b> Tratamientos para reparar lesiones osteocondrales. A) Representación esquemática de técnicas de estimulación de la MO, en el que se observan las microfracturas realizadas en el hueso subcondral. Modificada de Benthien y Behrens (2011). B) Imagen de un cóndilo femoral al que se le ha colocado periostio en el tratamiento de implantación de condrocitos autólogos. Modificada de Fuentes-Boquete y col. (2007). C) Imágenes en las que se observa la obtención y posterior implante de cilindros osteocondrales en una zona de lesión. Modificada de Zelken (2016). D) Representación esquemática de la IT del cartílago. Modificada de Vinatier y col. (2009) .....	17

<b>Figura 8.</b> Imagen esquemática de la forma de obtención de las <i>ESCs</i> e <i>iPS</i> y su posible uso en la IT del cartílago y hueso. Modificada de <a href="http://stemcelloverview.weebly.com/classes-of-stem-cells.html">http://stemcelloverview.weebly.com/classes-of-stem-cells.html</a> .....	22
<b>Figura 9.</b> Extracción de células de la MO de la cabeza femoral humana. A) Lavado de la MO mediante inyecciones con medio. B) Filtrado de la suspensión obtenida. C) El precipitado celular obtenido tras la centrifugación del filtrado .....	38
<b>Figura 10.</b> Extracción de células del aspirado de médula ovina. A) Aspirado de cresta ilíaca. B y C) El coágulo del aspirado de médula se troceó y esparció sobre una placa adherente .....	39
<b>Figura 11.</b> Derivación de <i>iPS</i> hacia células similares a CMEs (CSMEs). A) Colonias de <i>iPS</i> sobre <i>feeders</i> . B) Colonias de <i>iPS</i> adaptadas a <i>Matrigel</i> . C) Grupos de <i>EBs</i> sembrados en conjunto para diferenciar hacia CSMEs no clonales (NC-CSMEs). D) <i>EBs</i> sembrados de forma independiente para diferenciar hacia CSMEs pseudo-clonales (C-CSMEs) .....	40
<b>Figura 12.</b> Cultivo de las CMEs-MO sobre los diferentes biomateriales. A) Cultivo de CMEs-MO visualizado en un microscopio óptico invertido. B) Imagen de una esponja de Col previa al cultivo y tabla de la composición de los diferentes soportes utilizados para la diferenciación condrogénica. C) Imagen de un constructo en cultivo .....	50
<b>Figura 13.</b> Modelo de lesión de cartílago articular ovino y humano <i>in vitro</i> . A) Obtención de cartílago a partir de la cabeza femoral humana. B) Obtención de cilindros condrales mediante un punzón de biopsias. C) Obtención de cartílago a partir de cóndilo femoral ovino. D) Generación de la lesión con una fresa odontológica. E) Siembra de las CMEs-MO sobre las esponjas. F) Imagen de un constructo introducido en una lesión de cartílago humano. G) Imagen de un constructo introducido en una lesión de cartílago ovino .....	53
<b>Figura 14.</b> Caracterización fenotípica de las células aisladas de MO humana. A) Imagen obtenida al microscopio óptico de las células aisladas. B) Porcentajes de positividad obtenidos por las células aisladas para los diferentes marcadores de superficie .....	63

**Figura 15.** Diferenciación adipogénica de las células aisladas de MO humana. A) Imágenes de la tinción con *Oil Red O* de las células estimuladas con medio adipogénico y de las células control, crecidas en *DMEM20%*. B) NRE de los genes característicos de adipocitos, *ADPN*, *LPL* y *FABP4*. Adipog: células estimuladas adipogénicamente; Ctrl adipog: células control sin estimular ..... 64

**Figura 16.** Diferenciación osteogénica de las células aisladas de MO humana. A) Imágenes de la tinción con Rojo Alizarina de las células estimuladas con medio osteogénico y de las células control, crecidas en *DMEM20%*. B) NRE de los genes característicos de osteoblastos, *ALP* y *OP*. Osteog: células estimuladas osteogénicamente; Ctrl osteog: células control sin estimular ..... 65

**Figura 17.** Diferenciación condrogénica en micromasas de las células aisladas de MO humana. A) Imágenes de las tinciones e inmunotinciones de las células estimuladas y de las células control de: H-E, TM, SO, Col I, Col II, Agg, Col X y *MMP13*. Las imágenes de menor tamaño se corresponden con las micromasas no estimuladas. B) NRE de los genes característicos de condrocitos, *SOX9*, *COL2* y *AGG*, y no característicos como el *COL1*. Condrog: micromasas cultivadas en medio condrogénico; Ctrl Condrog: micromasas cultivadas en medio *DMEM20%*. Aumento 100x ..... 66

**Figura 18.** Caracterización fenotípica de las células aisladas de MO ovina. A) Imagen obtenida al microscopio óptico de las células aisladas. B) Porcentajes de positividad obtenidos por las células aisladas para los marcadores de superficie, en los que se obtuvo reactividad de los Ac ..... 68

**Figura 19.** Diferenciación adipogénica de las células aisladas de MO ovina. A) Imágenes de la tinción con *Oil Red O* de las células estimuladas con medio adipogénico y de las células control, a 0 y 21 días. B) NRE de los genes característicos de adipocitos, *LPL* y *FABP4*, y de los genes de indiferenciación, *VIM* y *SOX2*. Ctrl 0d: control de células a 0 días de diferenciación; Ctrl 21d: control de células cultivadas 21 días en *DMEM20%*; Adipog: células cultivadas en medio de estimulación adipogénico. Aumento 200x ..... 69

**Figura 20.** Diferenciación osteogénica de las células aisladas de MO ovina. A) Imágenes de la tinción con Rojo Alizarina de las células estimuladas con medio osteogénico y de las células control, a 0 y 21 días. B) NRE del gen característico de osteoblastos, OP, y de los genes de indiferenciación, VIM y SOX2. Ctrl 0d: control de células a 0 días de diferenciación; Ctrl 21d: control de células cultivadas 21 días en *DMEM20%*; Osteog: células cultivadas en medio de estimulación osteogénico. Aumento 200x ..... 70

**Figura 21.** Diferenciación condrogénica de las células aisladas de MO ovina. A) Imágenes de las tinciones e inmunotinciones de las micromasas estimuladas y de las control, cultivadas 21 días, de: H-E, TM, SO, Col II y Col I. Las imágenes de menor tamaño se corresponden con las micromasas no estimuladas. B) NRE, en las micromasas estimuladas y micromasas control tras 21 días y en el control a día 0, de los genes de indiferenciación (VIM y SOX2), de COL1 y de los genes característicos de condrocitos (COL2 y AGG). Ctrl 0d: control de células a 0 días de diferenciación; Ctrl 21d: control de células cultivadas 21 días en *DMEM20%*; Condrog: células cultivadas en medio de estimulación condrogénico. Aumento: imágenes grandes 200x e imágenes pequeñas 100x ..... 72

**Figura 22.** Caracterización fenotípica de las células derivadas de *iPS*, de forma no clonal (NC-CSMEs) y de forma pseudo-clonal (C-CSMEs), en comparación con las células mesenquimales estromales de tejido adiposo (CMEs-TA). A) Imagen obtenida al microscopio óptico de las células derivadas. B) Porcentajes de positividad obtenidos por las células para los marcadores de superficie ..... 73

**Figura 23.** Diferenciación adipogénica de las CMEs-TA, las NC-CSMEs y las C-CSMEs. A) Imágenes de la tinción con *Oil Red O* de las células estimuladas con medio adipogénico (aumento 80x). B) NRE de los genes característicos de adipocitos, ADPN, LPL y *PPARg* ..... 74

**Figura 24.** Diferenciación osteogénica de las CMEs-TA, las NC-CSMEs y las C-CSMEs. A) Imágenes de la tinción con Rojo Alizarina de las células estimuladas con medio osteogénico (aumento 20x). B) NRE de los genes característicos de osteoblastos, OP, *ALP* y *Sp7* ..... 75

**Figura 25.** Diferenciación condrogénica de las CMEs-TA, las NC-CSMEs y las C-CSMEs. A) Imágenes de las tinciones con TM y SO de las micromasas estimuladas con medio condrogénico. B) NRE de los genes característicos de condrocitos (*AGG* y *HAPLN1*). C) Ratio de los NRE de COL2/COL1 ..... 76

**Figura 26.** Imágenes de las tinciones (filas) de H-E, TM e inmunotinciones con *PCNA* de los constructos cultivados durante 15 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM20%*). En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x ..... 78

**Figura 27.** Imágenes de las tinciones (filas) de H-E, TM e inmunotinciones con *PCNA* de los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM20%*). En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x ..... 79

**Figura 28.** NRE de los genes característicos de condrocitos *SOX9*, *COL2* y *AGG*, en los constructos condrogénicos y control, tras 30 días de cultivo. \*, # Diferencias significativas ..... 80

**Figura 29.** Estudio de componentes característicos de la MEC de condrocitos, en los constructos cultivados durante 15 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM20%*). Imágenes de la tinción (filas) de SO e inmunotinciones con *Agg* y Col II; en las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x..... 81

**Figura 30.** Estudio de componentes característicos de la MEC de condrocitos, en los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM20%*). Imágenes de la tinción (filas) de SO e inmunotinciones con *Agg* y Col II; en las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x ..... 82

**Figura 31.** Gráfico de la liberación de Col ( $\mu\text{g}$ ) a los sobrenadantes de los cultivos de los diferentes constructos, entre los días 0-28 de cultivo, en medio condrogénico y medio control (*DMEM*20%) ..... 84

**Figura 32.** Estudio de otros componentes en la MEC de los constructos cultivados durante 15 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM*20%). Imágenes de la tinción (filas) de *VK* e inmunotinciones con Col I, Col X y *MMP13*. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x ..... 85

**Figura 33.** Estudio de otros componentes en la MEC en los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM*20%). Imágenes de la tinción (filas) de *VK* e inmunotinciones con Col I, Col X y *MMP13*. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x ..... 86

**Figura 34.** Estudio morfológico y ultraestructural de los diferentes constructos condrogénicos, tras 15 y 30 días de cultivo, mediante MEB y MET.★: vesículas de secreción;★: vesículas electrón-densas;☆: retículo endoplasmático rugoso;➡: fibras de la MEC;➡: células;➡: fibras del biomaterial;➡: mitocondrias; Nuc: núcleo ..... 88

**Figura 35.** Imágenes de las tinciones (filas) de H-E, TM e inmunotinciones con *PCNA* de los constructos, cultivados durante 30 días en medio condrogénico. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I +OLH3, Col I +CHS, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS. Aumento 200x ..... 91

**Figura 36.** NRE de los genes característicos de condrocitos (*SOX9*, *COL2* y *AGG*) y no característicos (*COL1* y *COL10*) en los constructos condrogénicos, tras 30 días de cultivo. \* Diferencias significativas ..... 92

**Figura 37.** Estudio de componentes característicos de la MEC de condrocitos, en los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico. Imágenes de la tinción (filas) de *SO* e inmunotinciones con *Agg* y Col II. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I

+OLH3, Col I +*CHS*, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +*CHS*.  
Aumento 200x ..... 94

**Figura 38.** Gráfico de la liberación de Col (µg) a los sobrenadantes de los cultivos de los diferentes constructos, entre los días 0-28 de cultivo, en medio condrogénico ..... 95

**Figura 39.** Estudio de otros componentes en la MEC de los constructos cultivados durante 30 días, en medio condrogénico. Imágenes de la tinción (filas) de *VK* e inmunotinciones con Col I, Col X y *MMP13*. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I +OLH3, Col I +*CHS*, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +*CHS*. Aumento 200x ..... 96

**Figura 40.** Estudio morfométrico y ultraestructural de los constructos condrogénicos, tras 30 días de cultivo, mediante MEB y MET. ☆: células apoptóticas; ★ : vesículas de secreción; ★ : vesículas electrón-densas; ➡ : MEC; ⇨: fibras del biomaterial; ➡: células; ➡: mitocondrias; Nuc: núcleo ..... 98

**Figura 41.** Estudio de la diferenciación osteogénica de las oCMEs-MO sobre los soportes, tras 30 días de cultivo. Imágenes de la tinción (filas) de H-E, *VK* y Rojo Alizarina e inmunotinciones con Col I y OCN. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I y β-FTC. Aumento 100x..... 101

**Figura 42.** Estudio morfométrico y ultraestructural de los diferentes constructos osteogénicos, tras 30 días de cultivo, mediante MEB y MET. ⇨: biomaterial; ➡: células; ➡: mitocondrias; ★: precipitados; ★: vesículas de secreción; Nuc: núcleo ..... 103

**Figura 43.** Estudio mediante EDX de los constructos osteogénicos de Col I, cultivados durante 30 días. A) Imagen de MEB de la zona analizada posteriormente con EDX, en la que se observa una zona de precipitado (1) y una zona de células (2). B) Espectros obtenidos del análisis con EDX de la zona de precipitado (1) y de la zona de células (2) ..... 104

**Figura 44.** Valoración de la reparación en el modelo de lesión No-IL en cartílago humano, en el que se introdujeron constructos de Col I, Col I +3%HS, Col I +Col II+ HS y Col I +Col II +CHS y que se cultivaron durante

60 días en medio condrogénico. A) Imágenes de las tinciones histológicas H-E, SO y TM del modelo y sus controles (Ctrl). B) Valoración obtenida por el modelo en la escala *ICRS II* modificada ..... 106

**Figura 45.** Valoración de la reparación en el modelo de lesión IL en cartílago humano, en el que se introdujeron constructos de Col I, Col I +3%HS, Col I +Col II+ HS y Col I +Col II +CHS y que se cultivaron durante 60 días en medio condrogénico. A) Imágenes de las tinciones histológicas H-E, SO y TM del modelo. B) Valoración obtenida por el modelo en la escala *ICRS II* modificada ..... 107

**Figura 46.** Imágenes de las tinciones inmunohistoquímicas de Col II, *Agg*, Col I y Col X de los modelos No-IL e IL, tras 60 días de cultivo en medio condrogénico. Aumento 40x ..... 109

**Figura 47.** Valoración de la reparación en el modelo de lesión en cartílago ovino, en el que se introdujeron constructos de Col I y que se cultivaron durante 60 días en medio condrogénico. A) Imágenes de las tinciones histológicas (H-E, SO y TM) e inmunohistoquímicas (Col II y *Agg*) de las diferentes réplicas del modelo. H-E del control (Ctrl) de lesión y del control sin células. B) Valoración obtenida por las réplicas del modelo, en la escala *ICRS II* modificada ..... 111



## LISTADO DE TABLAS



<b>Tabla 1.</b> Ac utilizados en la citometría de flujo, para la caracterización de los marcadores de superficie expresados por las CMEs humanas y ovinas. <i>PE</i> , ficoeritrina ( <i>phycoerythrin</i> ); <i>PECy5</i> , ficoeritrina con cianina 5 ( <i>phycoerythrin with cyanin-5</i> ); <i>FITC</i> , isotiocianato de fluoresceína ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> ).....	42
<b>Tabla 2.</b> Cebadores utilizados en la <i>qRT-PCR</i> para detectar la expresión de genes en A) CMEs humanas y ovinas y B) en CSMEs.* Genes constitutivos .	44
<b>Tabla 3.</b> Ac utilizados en la citometría de flujo, para la caracterización de los marcadores de superficie expresados por las CSMEs y las CMEs-TA. <i>APC</i> , Aloficocianina ( <i>Allophycocyanin</i> ); <i>PE</i> , ficoeritrina ( <i>phycoerythrin</i> ); <i>FITC</i> , isotiocianato de fluoresceína ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> ) .....	47
<b>Tabla 4.</b> Tabla resumen de los resultados histológicos e inmunohistoquímicos de los constructos de Col I y HS, a 15 y 30 días de cultivo en medio control ( <i>DMEM20%</i> ) y medio condrogénico (Condrog). Los mejores resultados obtenidos por los constructos condrogénicos se sombrearon en verde (Anexo III) .....	185
<b>Tabla 5.</b> Tabla resumen de los resultados histológicos e inmunohistoquímicos de los constructos de Col I y Col II y GAGs, a 30 días de cultivo en medio condrogénico. Los mejores resultados obtenidos por los constructos condrogénicos se sombrearon en verde (Anexo III) .....	186



**RESUMEN**

**XLVII**



La artrosis (OA) es la patología reumática más prevalente y, actualmente, no existe un tratamiento efectivo. Una de las causas de la enfermedad es su desarrollo secundario tras una lesión en el cartílago hialino articular o en el hueso subcondral. La Ingeniería Tisular (IT) osteocondral, utilizando células y soportes, ha surgido como una terapia prometedora.

El objetivo de este estudio fue determinar el potencial de reparación de las células mesenquimales estromales (CMEs), en combinación con diferentes tipos de soportes, para su uso en la IT osteocondral.

En primer lugar, se aislaron y caracterizaron CMEs, obtenidas de médula ósea humana y ovina, y de células similares a CMEs (CSMEs), diferenciadas a partir de células pluripotentes inducidas (*iPS*). En segundo lugar, se estudió la capacidad de diferenciación condrogénica de las CMEs humanas, cultivadas en diferentes soportes de colágeno (Col). También, se testó la capacidad de diferenciación osteogénica de las CMEs ovinas, cultivadas sobre soportes de Col I y  $\beta$  fosfato tricálcico ( $\beta$ -FTC). Por último, se analizó la capacidad de reparación de las CMEs, cultivadas en soportes de Col, en un modelo de lesión de cartílago *in vitro*.

Los resultados confirman la identidad de las CMEs y su capacidad de formar neotejidos condrogénicos y osteogénicos sobre biomateriales de Col. La presencia de proteoglicanos (PGs) en la composición de los soportes mejora el fenotipo del tejido cartilaginoso neoformado y la reparación de lesiones en el cartílago hialino, en un modelo *in vitro*.

El uso de los constructos, formados por las CMEs y biomateriales de Col, resulta prometedor para la reparación de lesiones osteocondrales.





**RESUMO**

**LI**



A artrose (OA) é a patoloxía reumática máis prevalente e, na actualidade, non existe un tratamento efectivo. Unha das causas deste trastorno é o desenvolvemento secundario tras unha lesión na cartilaxe hialina articular ou no óso subcondral. A Enxeñería Tisular (IT) osteocondral, utilizando células e soportes, xurdiu como unha terapia prometedora.

O obxectivo deste estudo foi determinar o potencial de reparación das células mesenquimais estromais (CMEs), en combinación con diferentes tipos de soportes, para o seu uso na IT osteocondral.

En primeiro lugar, illáronse e caracterizáronse CMEs, obtidas de medula ósea humana e ovina, e de células similares a CMEs (CSMEs), diferenciadas a partir de células pluripotentes inducidas (*iPS*). En segundo lugar, estudouse a capacidade de diferenciación condroxénica das CMEs humanas, cultivadas en diferentes soportes de coláxeno (Col). Tamén, testouse a capacidade de diferenciación osteoxénica das CMEs ovinas, cultivadas sobre soportes de Col I e  $\beta$  fosfato tricálcico ( $\beta$ -FTC). Por último, analizouse a capacidade de reparación das CMEs, cultivadas en soportes de Col, nun modelo de lesión de cartilaxe *in vitro*.

Os resultados confirman a identidade das CMEs e a súa capacidade de formar neotecidos condroxénicos e osteoxénicos sobre biomateriais de Col. A presenza de proteoglicans (PGs) na composición dos soportes mellora o fenotipo condroxénico do tecido cartilaxinoso neoformado e a reparación de lesións na cartilaxe hialina, nun modelo *in vitro*.

O uso dos constructos, formados polas CMEs e biomateriais de Col, resulta prometedor para a reparación de lesións osteocondrais.



**ABSTRACT**

LV



Osteoarthritis (OA) is the most prevalent rheumatic disorder and currently, there is no effective treatment to treat it. Lesions in the articular hyaline cartilage or in the subchondral bone may lead secondarily to OA. Osteochondral Tissue Engineering (IT) using cells and scaffolds has emerged as a promising therapy.

The aim of this study was to determine the repair potential of mesenchymal stromal cells (CMEs) combined with different types of scaffolds, and their usefulness in osteochondral IT.

First, CMEs from human and ovine bone marrow and, from induced pluripotent stem cells (iPS) were isolated and characterized. Secondly, chondrogenic differentiation capacity of human CMEs on collagen (Col) scaffolds was studied. Also, osteogenic differentiation capacity of ovine CMEs on Col I and  $\beta$  tricalcium phosphate ( $\beta$ -FTC) was tested. Finally, the repair capacity of CMEs cultured on Col scaffolds in an *in vitro* cartilage lesion model was assessed.

Results confirmed the CMEs identity and their capacity to form chondrogenic and osteogenic neotissues, when cultured on Col scaffolds. The addition of proteoglycans (PGs) to the scaffold composition improves the phenotype of neoformed cartilaginous tissue and the repair capacity in the *in vitro* hyaline cartilage lesion model.

The use of CMEs and Col scaffolds for engineered tissue constructs is a promising approach for osteochondral lesions repair.





## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN



El cartílago articular hialino es un tejido altamente especializado que presenta unas características bioquímicas y mecánicas únicas. Este tipo de cartílago se encuentra, principalmente, en las articulaciones sinoviales. Patologías como la artrosis (OA, *osteoarthritis*) pueden afectar a cualquier tipo de articulación pero se manifiestan mayormente en este tipo de articulaciones. Una de las causas que pueden dar lugar a la OA de forma secundaria, son las lesiones en el cartílago articular o el hueso subcondral. A pesar de los avances en la fisiopatogenia de la OA, todavía hay un gran desconocimiento sobre su etiología y evolución, ya que se trata de un desorden multifactorial. A pesar de todas las terapias disponibles no existe un tratamiento eficaz para curar la OA. Hoy en día, la Ingeniería Tisular (IT), utilizando las células y los soportes adecuados, supone una herramienta con potencial regenerativo y terapéutico en lesiones osteocondrales.

### 1.1. Clasificación estructural de las articulaciones

Una articulación es la unión entre huesos. Según el modo en que tiene lugar esta unión, las articulaciones se clasifican estructuralmente en tres tipos (Moore y Agur, 2003; Merí, 2005; Jiménez-Castellanos y col., 2007):

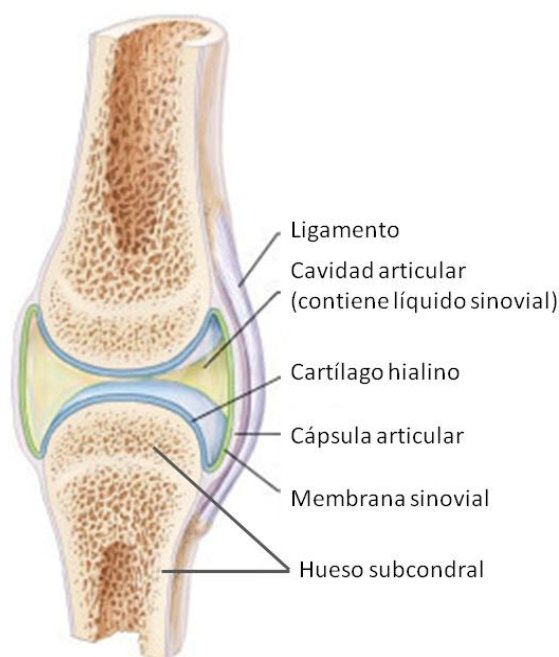
- **Sinartrosis.** Sus superficies articulares están unidas por tejido conjuntivo fibroso denso. Este tipo comprende las articulaciones de los huesos del cráneo (suturas), las articulaciones alveolodentarias (gonfosis) y las articulaciones mediadas por ligamentos (sindesmosis). De éstas, sólo las sindesmosis permiten cierto grado de movilidad.
- **Anfiartrosis.** Sus superficies articulares están unidas por cartílago fibroso (sínfisis) o hialino (sincondrosis). Permiten cierto grado de movilidad.
- **Diartrrosis o articulaciones sinoviales.** Se caracterizan por tener superficies articulares libres, que se deslizan entre sí. Son las más numerosas y anatómicamente complejas, y permiten una gran movilidad y diversos tipos de movimiento.

## 1.2. Articulación sinovial

### 1.2.1. Estructura de la articulación sinovial

Las articulaciones sinoviales constan de los siguientes elementos (Moore y Agur, 2003; Jiménez-Castellanos y col., 2007) (Figura 1):

- **Cartílago hialino articular** (en adelante, cartílago articular). Reviste las superficies óseas articulares, protegiendo al hueso de dos maneras:
  - Aportando una superficie libre de deslizamiento, muy lisa y pulida, y resistente al desgaste.
  - Absorbiendo una parte importante de la fuerza de compresión, de modo que disminuye la carga que soporta el hueso subyacente.
- **Hueso subcondral**. Consiste en hueso compacto subyacente al cartílago articular, al que se une mediante adherencia. El hueso subcondral aísla al cartílago articular de la vascularización e inervación ósea.



**Figura 1.** Representación esquemática de los elementos básicos que componen la articulación sinovial. Modificada de <https://quizlet.com/60157233/joints-part-2-synovial-joint-flash-cards/>.

- **Medios de coaptación.** Son superficies articulares accesorias constituidas por fibrocartílago, presentes en algunas articulaciones, que aumentan la concordancia entre las superficies articulares. Según su forma, se denominan:
  - **Meniscos articulares.** Son dos láminas fibrocartilaginosas en forma de anillo incompleto que se disponen entre las superficies articulares de la rodilla. Sus dos caras articulares son libres. Cada menisco está unido por su periferia a la cápsula articular. Los meniscos conducen el contacto de las superficies articulares, aportando estabilidad.
  - **Disco articular.** Es una lámina fibrocartilaginosa que divide completamente la cavidad articular en dos cámaras (ejemplo: articulación esternoclavicular).
  - **Rodete articular.** Es un anillo fibrocartilaginoso dispuesto en el borde de cavidades articulares que representan un segmento de esfera. Aumenta la cavidad articular sin afectar en gran medida a la amplitud máxima del movimiento (ejemplos: articulaciones escapulohumeral y coxofemoral).
- **Medios de unión.** Mantienen la estabilidad articular, uniendo entre sí los elementos óseos. Estos medios de unión incluyen:
  - **Medios de unión pasivos (o medios ligamentosos).** Constituidos por tejido conjuntivo fibroso denso, responden a dos tipos:
    - Cápsula articular. Es un tejido fibroso que se inserta en las superficies óseas, próximas a las superficies articulares, para formar una envoltura completa alrededor de los extremos de los huesos y mantener el contacto de las superficies articulares (Figura 1). Es tanto más laxa cuanto más móvil es la articulación y más amplios son sus movimientos.  
Otros autores consideran que la cápsula articular está formada por una cápsula fibrosa y la membrana sinovial (Blanco García, 2002).
    - Ligamentos. Se disponen donde la cápsula articular debe presentar mayor resistencia (Figura 1). Pueden ser engrosamientos de la cápsula articular (ligamentos capsulares) o bien estar independizados de ésta, disponiéndose por dentro de la

cápsula (ligamentos intracapsulares) o por fuera de ella (ligamentos extracapsulares).

- **Medios de unión activos.** Constituidos por los músculos periarticulares y sus tendones.
- **Membrana y líquido sinovial.** La membrana sinovial reviste la cara articular de la cápsula y la superficie ósea intracapsular que no está cubierta por cartílago articular. La membrana sinovial presenta una capa celular íntima, en la que se encuentran los sinoviocitos, que descansa sobre una lámina subintimal de tejido conjuntivo muy vascularizado y que contiene tejido adiposo.  
La membrana sinovial produce el líquido sinovial, que ocupa la cavidad articular. Este líquido es transparente, viscoso y filante. Sus funciones incluyen la lubricación del cartílago (facilitando el deslizamiento de las superficies articulares) y la nutrición del cartílago articular (el cartílago carece de vasos sanguíneos, de modo que se nutre por imbibición a expensas del líquido sinovial).
- **Cavidad articular.** Corresponde al pequeño espacio comprendido entre las superficies articulares y la membrana sinovial. Está ocupada por el líquido sinovial.

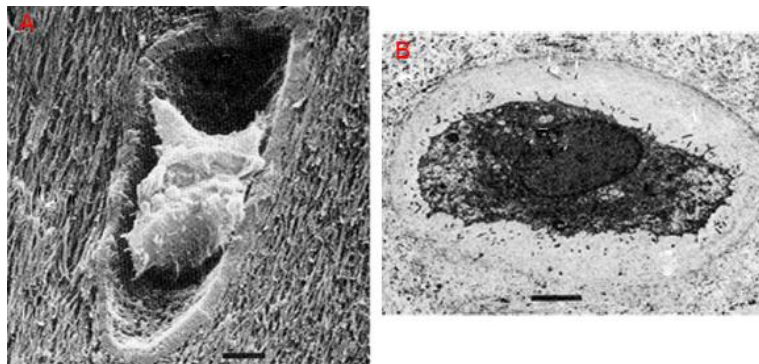
### 1.3. Cartílago articular

El cartílago articular presenta un aspecto blanquecino brillante, con un grosor que oscila entre los 2-3 mm. Ofrece una superficie de apoyo resistente, lisa y lubricada para un movimiento de deslizamiento sin fricción entre las dos superficies articulares. Debido a su elasticidad, el cartílago articular absorbe una parte importante de la fuerza de compresión, de modo que disminuye la carga que soporta la estructura ósea subyacente.

El componente celular del cartílago articular representa el 1-2% del volumen total del tejido y se encuentra embebido en su propia matriz extracelular (MEC) (Blanco García, 2002).

### 1.3.1. Componente celular del cartílago articular

El cartílago articular está constituido por un único elemento celular, los condrocitos. Los condrocitos se encuentran en cavidades denominadas lagunas (Figura 2 A y B) que están conectadas a través de conductos por los que discurren prolongaciones citoplasmáticas de los condrocitos, estableciendo contactos mediante uniones *gap* entre las células (Mayan y col., 2013).

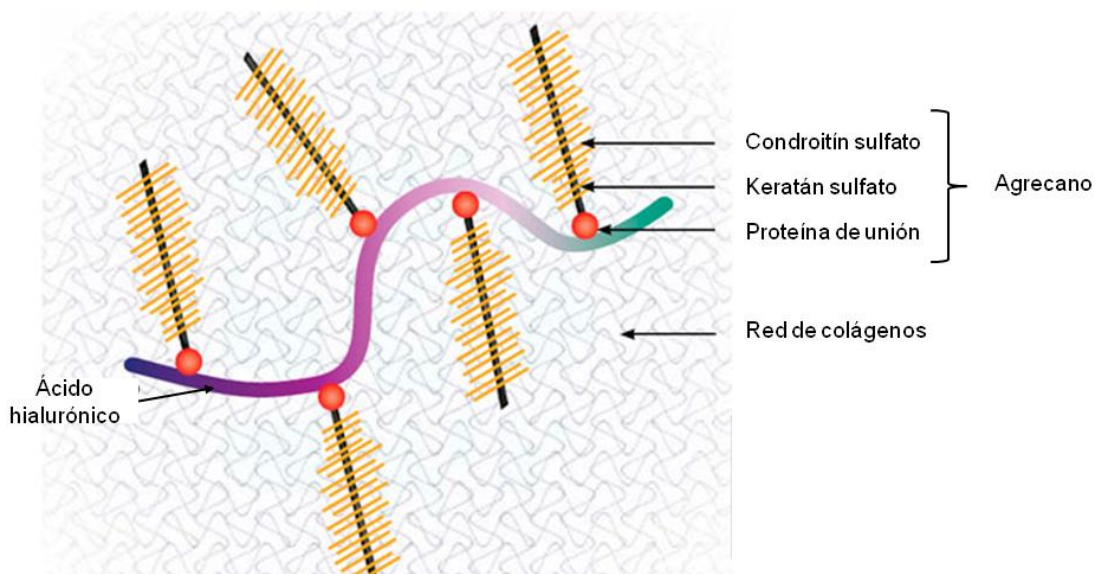


**Figura 2.** Imagen de microscopía electrónica A) de barrido (MEB) y B) de transmisión (MET), en las que se observa una laguna condrocitaria. Imágenes modificadas de Poole y col. (1987).

La función más importante del condrocito es la producción y el mantenimiento del tejido, mediante el balance entre la síntesis y degradación de la MEC.

### 1.3.2. Matriz extracelular del cartílago articular

La complejidad de la MEC confiere al cartílago articular su fuerza y estructura (Bhosale y Richardson, 2008). La MEC está principalmente compuesta por una red de colágeno (Col) (Figura 3) que le confiere fuerza de tensión (Bhosale y Richardson, 2008) y que supone entre un 20-40% del peso seco total del cartílago (Blanco García, 2002). De este porcentaje, el 90-95% está constituido por Col de tipo II (Col II) (Blanco García, 2002; Bhosale y Richardson, 2008). En menor porcentaje, existen otros tipos de Col, como el de tipo VI (Col VI), de tipo IX (Col IX) y de tipo XI (Col XI), cuyas funciones son de anclaje, conexión y formación interfibrilar; o el de tipo X (Col X), que está relacionado con la hipertrofia celular (Bhosale y Richardson, 2008).



**Figura 3.** Representación esquemática de la estructura de los agregados de agregano (Agg). Imagen modificada de <http://www.seleccionesveterinarias.com/es/articulos/traumatologia-veterinaria/condroprotectores-en-el-manejo-de-la-osteoartritis-de-perros-y-gatos>.

Los proteoglicanos (PGs) suponen entre el 10-20% de la MEC del cartílago hialino y le confieren fuerza de compresión, resistencia y elasticidad (Blanco García, 2002; Bhosale y Richardson, 2008). El 10% de los PGs son de tamaño pequeño, como pueden ser la decorina, el biglican o la fibromodulina. El 90% de los PGs restantes son agreganos (*Agg*, *aggrecan*) (Figura 3), compuestos de glucosaminoglicanos (GAGs), condroitín sulfato (*CHS*, *chondroitin sulfate*) y keratán sulfato (Figura 3), anclados a una proteína central. Los *Agg* se unen al ácido hialurónico (AH) mediante una proteína de unión para formar macroagregados de *Agg* (Bhosale y Richardson, 2008) (Figura 3).

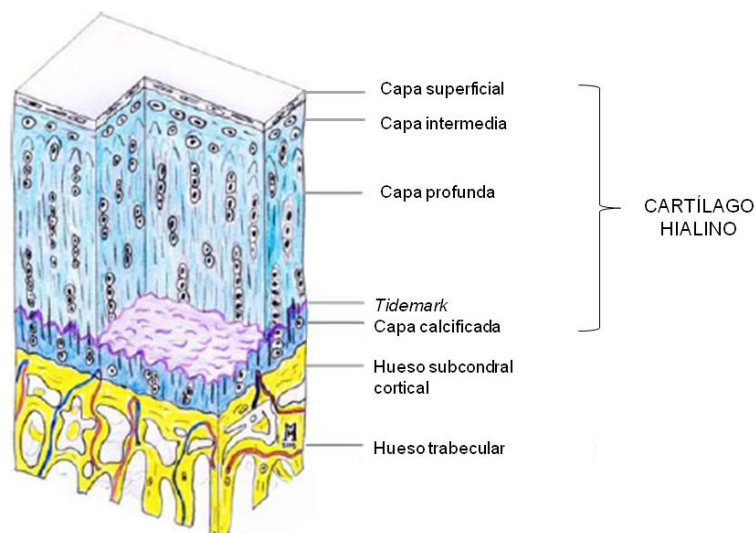
Estos PGs sulfatados confieren una alta carga negativa y, por tanto, una mayor capacidad de hidratación (Gomoll y Minas, 2014). Esta característica es muy importante, ya que el 65-80% del peso total del cartílago es agua (Blanco García, 2002; Sophia Fox y col., 2009).



### 1.3.3. Estructura histológica del cartílago articular

El cartílago articular está compuesto por cuatro capas histológicas (Figura 4) (Blanco García, 2002; Castañeda Sanz y Herrero-Beaumont, 2005; Madry y col., 2010):

- 1) **Capa superficial del cartílago articular.** En la región más superficial de esta capa se encuentra la *lamina splendens*, desprovista de células y constituida únicamente por fibras de Col. En el resto de la capa, los condrocitos son pequeños y aplanados, disponiéndose de forma paralela a la superficie. La cantidad de agua en esta capa es mayor, disminuyendo gradualmente según aumenta la profundidad. La concentración de Col II en la MEC también es mayor, distribuyéndose sus fibras paralelamente a la superficie de la articulación, mientras que la concentración de PGs está disminuida.
- 2) **Capa intermedia del cartílago articular.** En esta región hay un menor número de condrocitos que son más grandes y esféricos que en la capa superficial. Los condrocitos se encuentran solos o en grupos, con una distribución aleatoria. En esta capa se encuentra la mayor concentración de PGs de la MEC. Las fibras de Col II se distribuyen oblicuamente a través de la matriz.
- 3) **Capa profunda del cartílago articular.** Los condrocitos presentes en esta capa muestran morfología elíptica y forman alineamientos columnares de forma perpendicular a la superficie, de 2-6 células. Las fibras de Col II también presentan una orientación perpendicular a la superficie del hueso. Finalmente, el frente de mineralización o *tidemark* es la zona de transición hacia el cartílago calcificado, en el que las fibras de Col II lo cruzan para unirlo con el cartílago no calcificado.
- 4) **Capa calcificada del cartílago articular.** En esta capa existe un menor número de condrocitos que están hipertrofiados y se encuentran esparcidos. Las fibras de Col se extienden de forma perpendicular a la superficie articular, desde la capa profunda hasta la capa calcificada, sin atravesar el hueso subcondral. El Col mayoritario en esta zona es el Col X.



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura de la unidad osteocondral. Modificada de Madry y col. (2010).

#### 1.4. El hueso subcondral

El hueso subcondral (Figura 4) es tejido óseo compacto, cuyo grosor depende de la articulación en la que se encuentra y de otros factores (por ejemplo la edad), que impide que la vascularización llegue a la capa calcificada.

El tejido óseo presente en las articulaciones diartrodiales se forma durante la embriogénesis o remodelación ósea, mediante la osificación endocondral (Giannoudis y col., 2015). Las principales funciones del hueso subcondral son las de proveer soporte al cartílago articular, absorber parte de las tensiones mecánicas para que no afecten al hueso trabecular y distribuir la carga mecánica a las zonas yuxtaarticulares (Castañeda Sanz y Herrero-Beaumont, 2005; Madry y col., 2010). El hueso trabecular, con una estructura esponjosa y muy vascularizada que aloja a la médula ósea (MO), se dispone de forma subyacente al hueso subcondral. El hueso subcondral está constituido por una fase orgánica, formada por la MEC y el componente celular, que supone un 35-40% del volumen total (del que sólo el 8% corresponde al componente celular); y una fase mineral inorgánica, que supone un 40-45% (Walsh y col., 2003).

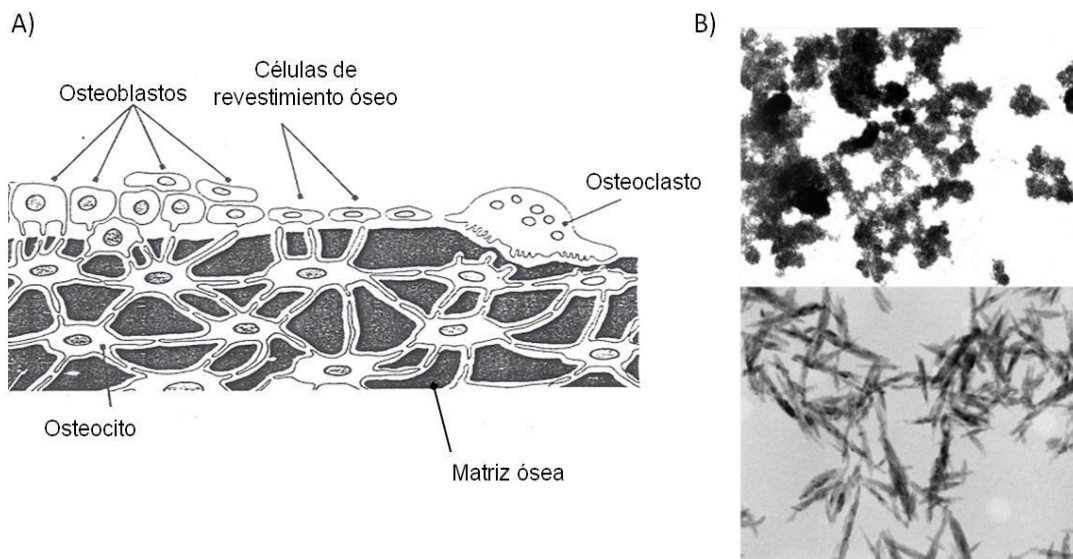
### 1.4.1. Fase orgánica del tejido óseo

La fase orgánica del hueso comprende el componente celular y la MEC.

#### 1.4.1.1. Componente celular del tejido óseo

El componente celular del hueso lo integran cuatro tipos de células que residen en distintas localizaciones del hueso (Figura 5 A) y que se encargan de regular la formación, el mantenimiento y la regeneración ósea (Giannobile y col., 2008):

- **Células de revestimiento óseo (*bone lining cells*)**. Son osteoblastos inactivos, con morfología aplanada, que se encuentran en la capa de Col no mineralizada de la superficie del hueso. Su función es la de degradar, mediante colagenasas, la capa de Col para permitir la reabsorción ósea por los osteoclastos.
- **Osteoblastos**. Son células activas, con morfología cuboidal, que no se dividen, ni migran. Estas células se disponen sobre la superficie ósea, estableciendo entre sí uniones *gap*. Se encargan de la síntesis, el ensamblaje y la mineralización de la MEC.
- **Osteocitos**. Son osteoblastos maduros aislados en lagunas de su propia MEC, cuya función es el mantenimiento de la matriz. Las lagunas están conectadas mediante conductos calcóforos, por los que discurren prolongaciones citoplasmáticas de los osteocitos, que establecen contacto entre sí, y también con los osteoblastos de la superficie ósea, a través de uniones *gap*. Este complejo sistema de interconexión celular se considera un mecanismo mecanosensorial de control del equilibrio entre la cantidad de hueso que se está formando y que se está destruyendo.
- **Osteoclastos**. Son células gigantes multinucleadas de origen hematopoyético, responsables de la reabsorción del hueso mineralizado. Se disponen en la superficie ósea, en zonas de remodelación y crecimiento.



**Figura 5.** A) Representación esquemática de la localización de los tipos celulares presentes en el hueso (imagen modificada de <http://periodoncia5toc.blogspot.com.es/2010/12/hueso-alveolar.html>). B) Imágenes de MET de un soporte compuesto de HA pura (modificadas de Huber y col., 2006).

#### 1.4.1.2. Matriz extracelular del tejido óseo

En el tejido óseo, la MEC supone sólo el 25% del peso total (Walsh y col., 2003), del cual un 10-20% es agua, un 30-40% es Col y el porcentaje restante, corresponde a PGs, glicoproteínas y otras proteínas, como la osteopontina (OP) o la sialoproteína ósea (Steiniche y Hauge, 2003; Walsh y col., 2003). El Col predominante es el de tipo I (Col I), un 90%, pero existe una pequeña proporción de tipo III (Col III), de tipo V (Col V) y Col IX. El Col le confiere al tejido óseo fuerza y elasticidad (Steiniche y Hauge, 2003; Walsh y col., 2003). Además, genera un entramado para el asentamiento de los cristales minerales.

#### 1.4.2. Fase mineral inorgánica del tejido óseo

El 67% del peso seco del hueso se compone de sales minerales inorgánicas, principalmente por fosfato cálcico cristalino: hidroxiapatita (HA)  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  (Figura 5 B) (Steiniche y Hauge, 2003; Walsh y col., 2003).

### **1.5. Unidad funcional osteocondral**

El estudio sobre la integridad del cartílago y del hueso subcondral se ha estado realizando de forma independiente, probablemente debido a que, a pesar de su origen común a partir de las células mesenquimales estromales (CMEs), ambos tejidos conjuntivos son radicalmente diferentes (Mao, 2005).

Por un lado, el cartílago articular es aneural y avascular. Debido a estas propiedades intrínsecas y a que presenta escasez de abastecimiento de células condroprogenitoras, el cartílago posee una capacidad limitada de auto-reparación (Claus y col., 2012; Zhang y col., 2012).

Por otro lado, el hueso está innervado y vascularizado y, además, las células osteoprogenitoras residen en su interior o pueden ser abastecidas rápidamente desde los vasos sanguíneos (Mao, 2005). Por ello, el tejido óseo posee una extraordinaria capacidad de regeneración. Sin embargo, en algunos casos se produce un desequilibrio en el balance biológico que afecta a la capacidad de auto-regeneración ósea. Ésto suele deberse a problemas metabólicos, a grandes defectos óseos después de un traumatismo o a una formación tumoral (Seebach y col., 2010; Rosset y col., 2014).

Algunas patologías que comienzan afectando al hueso subcondral terminan afectando secundariamente al cartílago suprayacente (Gomoll y col., 2010). Asimismo, el cartílago al carecer de innervación, las lesiones condrales no se detectan y los pacientes no reciben tratamiento médico hasta que se han formado lesiones más severas que afectan al hueso subcondral, como la formación de osteofitos o la pérdida ósea (Mao, 2005; Gomoll y col., 2010). Dada su estrecha relación, el cartílago articular y el hueso subcondral subyacente se han comenzado a valorar como una unidad funcional osteocondral (Gomoll y col., 2010).

### **1.6. La artrosis**

Tradicionalmente, la OA se ha definido como una patología articular degenerativa, caracterizada por la alteración en la integridad del cartílago

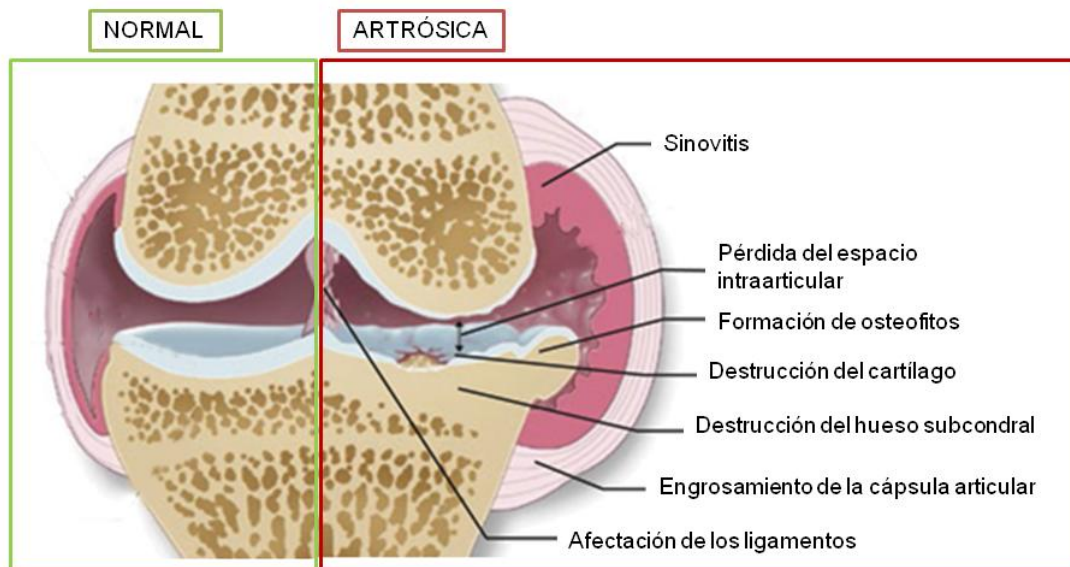
articular y el hueso subcondral (Blanco García, 2002). Actualmente, se sabe que aunque la degradación del cartílago articular es el evento central en la patogenia de la OA, el tejido sinovial y el hueso subcondral participan en el inicio y en el desarrollo de esta enfermedad. El grado de compromiso de estos componentes de la articulación no sólo conllevan a una variabilidad entre los cuadros clínicos de los pacientes, sino que incluso entre las diferentes articulaciones de un mismo paciente (Blanco García y Tornero Molina, 2016). Por ello, la Sociedad Internacional de Investigación en OA (*OARSI, Osteoarthritis Research Society International*) ha definido a la OA como un trastorno heterogéneo que afecta a las articulaciones móviles. Este trastorno se manifiesta como alteraciones genéticas, metabólicas e inflamatorias en la articulación, así como alteraciones anatómicas y/o fisiológicas que pueden dar lugar a la sintomatología asociada a la enfermedad (Kraus y col., 2015).

Desde los primeros estadios de la enfermedad, al inicio de las alteraciones moleculares, hasta que se observan cambios a nivel anatómico, pueden pasar años o incluso décadas (Kraus y col., 2015), por lo que es una enfermedad que se asocia al envejecimiento (Kock y col., 2012).

Microscópicamente, el cartílago OA se caracteriza por la pérdida de Col II y PGs, debido a la producción de enzimas catabólicas por parte de los condrocitos, lo que perturba la estructura de la MEC. En la capa superficial del cartílago articular, los condrocitos forman grupos isogénicos mientras que en capas más profundas se vuelven apoptóticos. A nivel macroscópico, todas las estructuras de la articulación sinovial se ven afectadas (Figura 6): formación de osteofitos, esclerosis subcondral, sinovitis y afectación de los ligamentos, entre otros (Zhang y col., 2016).

La OA es la patología articular más prevalente y la que con más frecuencia causa discapacidad física. La mayoría de personas mayores de 65 años manifiestan algún indicio de la enfermedad. La incidencia de la OA se espera que aumente en los próximos años junto con el incremento de la edad media de vida de la población (Brooks, 2002; Ross y Pawlina, 2007).

Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz que restaure las propiedades fisiológicas de la unidad osteocondral (Hermida Gómez, 2010; Dhollander y col., 2012; Filardo y col., 2013; Meretoja y col., 2013) y el estadio clínico final suele dar lugar al reemplazo protésico (Negri y col., 2007; Kraus y col., 2015).



**Figura 6.** Representación esquemática comparativa de la anatomía de una articulación normal y una articulación artrósica (imagen modificada de <https://www.zoetisus.com/products/pages/rimadyldvm/osteoarthritis.aspx>).

## 1.7. Tratamientos para lesiones focales

Los esfuerzos de la comunidad científica y médica se centran en buscar un tratamiento para curar las lesiones que puedan dar lugar secundariamente a la OA (Fuentes-Boquete y col., 2007; Zscharnack y col., 2010; Dhollander y col., 2012).

Los tratamientos quirúrgico/biológicos se centran en la restitución del tejido dañado. Para realizar este tipo de técnicas hay que tener en cuenta los patrones de lesión, ya que conllevan diferentes procesos de reparación: si es un daño parcial en el grosor articular, daño total en el grosor articular o daño osteocondral (Chiang y col., 2011). En la actualidad, otros tipos de tratamientos quirúrgicos basados en la Terapia Celular (TC) e IT están siendo objeto de estudio en la aplicación clínica.

La TC es un tipo de terapia biológica que se basa en la regeneración de un tejido u órgano dañado, como consecuencia de una lesión traumática o degenerativa, mediante el tratamiento con células (Mobasheri y col., 2014). La IT es una disciplina de la medicina regenerativa, cuya estrategia se basa en construir tejidos tridimensionales, mediante el uso combinado de: células, factores de crecimiento y soportes o biomateriales (Chan y Leong, 2008; Johnstone y col., 2013; Mobasheri y col., 2014; Wyles y col., 2015).

### 1.7.1. Técnicas de estimulación de la médula ósea

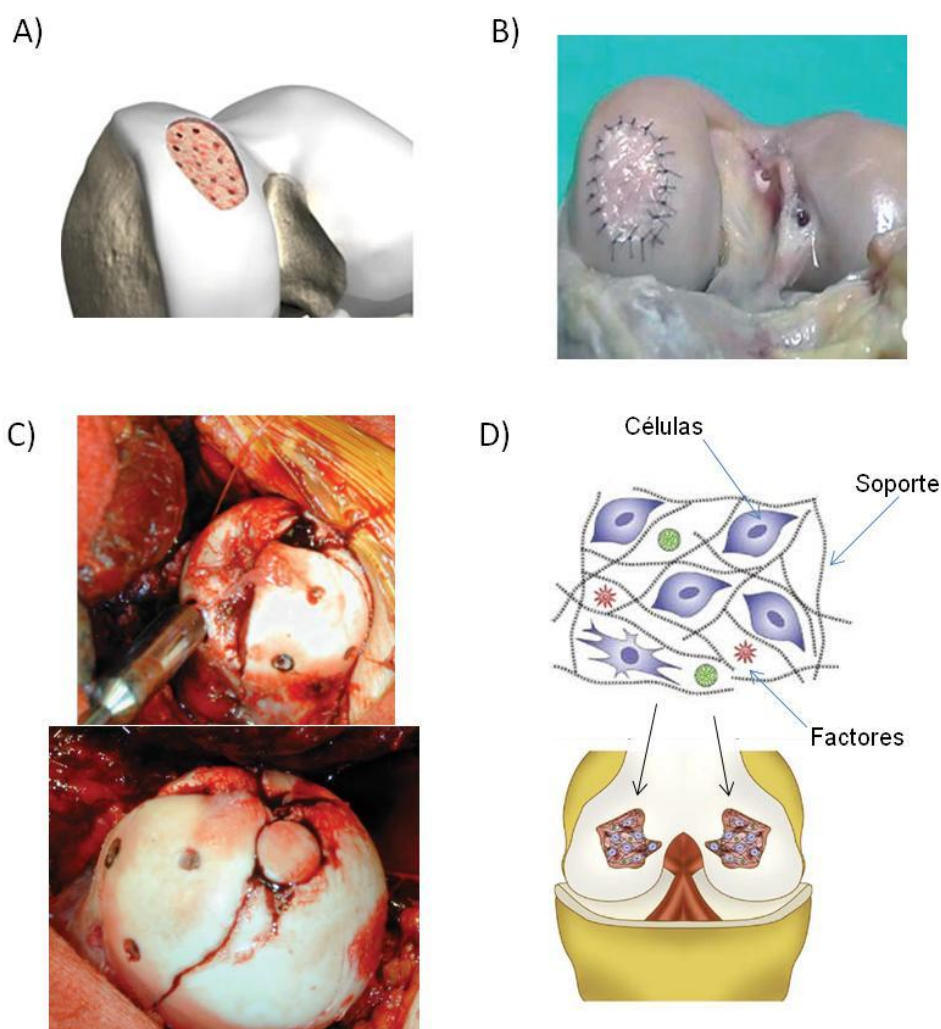
Las técnicas de estimulación de la MO (*MSTs, marrow-stimulating techniques*) son un tipo de tratamiento basado en la TC que se utiliza actualmente en clínica y que implica el uso de CMEs endógenas. Este tipo de tratamiento se realiza para tratar lesiones condrales de menos de 15 mm de diámetro (Vila y Rico y col., 2015). Las *MSTs* incluyen la perforación subcondral, la artroplastia por abrasión, el desbridamiento artroscópico o la microfractura (Figura 7 A) (Gomoll y col., 2010). Estas técnicas se basan en la perforación del hueso subcondral, para facilitar la invasión de la lesión por CMEs procedentes de la MO (CMEs-MO) y factores de crecimiento, y promover la formación de un coágulo en la base del defecto (Fuentes-Boquete y col., 2008). Este coágulo actúa como soporte celular y media la respuesta inflamatoria, mediante citoquinas, para inducir la reparación (Vila y Rico y col., 2015). El tejido de reparación que se genera suele ser fibrocartilaginoso, mayoritariamente compuesto por Col I. A pesar de la reparación, este tejido carece de las propiedades viscoelásticas del cartílago hialino (Gomoll y Minas, 2014) y con frecuencia termina degenerándose (Toh y col., 2014).

Una siguiente generación de tratamientos de TC incluye la combinación de los *MSTs* con la IT. Es el caso de la condrogénesis autóloga inducida por matriz (*AMIC, autologous matrix induced chondrogenesis*) que combina la microfractura con el uso de biomateriales de Col (Benthien y Behrens, 2011).

Algunos estudios describieron que estos tratamientos pueden dar lugar a cambios subcondrales que disminuyen la tasa de éxito en tratamientos posteriores (Gomoll y col., 2010). Además, se ha descrito que en presencia



de factores angiogénicos, como los que se localizan en la MO, se favorece la formación ósea de las mismas CMEs que, en ausencia de vascularización, son capaces de formar cartílago (Mao, 2005).



**Figura 7.** Tratamientos para reparar lesiones osteocondrales. A) Representación esquemática de técnicas de estimulación de la MO, en el que se observan las microfracturas realizadas en el hueso subcondral. Modificada de Benthien y Behrens (2011). B) Imagen de un cóndilo femoral al que se le ha colocado periostio en el tratamiento de implantación de condrocitos autólogos. Modificada de Fuentes-Boquete y col. (2007). C) Imágenes en las que se observa la obtención y posterior implante de cilindros osteocondrales en una zona de lesión. Modificada de Zelken (2016). D) Representación esquemática de la IT del cartílago. Modificada de Vinatier y col. (2009).

### 1.7.2. Autotrasplante de condrocitos autólogos

Otra técnica que se basa en la TC, actualmente utilizada como tratamiento quirúrgico, es el autotrasplante de condrocitos autólogos (*ACI*, *Autologous*

*chondrocyte implantation*) (Toh y col., 2014). Esta técnica sólo se utiliza para el tratamiento de lesiones focales condrales y consiste en la obtención y aislamiento de condrocitos autólogos que se inyectan en la lesión, previamente sellada con periostio del propio paciente (Figura 7 B) (Fuentes-Boquete y col., 2007). Entre las limitaciones de esta técnica destacan: la dificultad de conseguir una población numerosa de condrocitos, ya que se des-diferencian durante su expansión *in vitro* (Demoor y col., 2014; Rackwitz y col., 2014); sólo se puede realizar en lesiones de pequeño tamaño y que existe el riesgo de fracaso funcional a corto plazo (Fuentes-Boquete y col., 2007). Además, la obtención de condrocitos requiere un daño adicional al cartílago (Fuentes-Boquete y col., 2007; Dewan y col., 2014; Musumeci y col., 2014), al igual que en el hueso la obtención del periostio (Liao y col., 2007).

Una siguiente generación de tratamientos incluye la combinación del AC/ con la IT. Buen ejemplo de ello es el trasplante de condrocitos asociado a matriz (*MACT, matrix associated chondrocyte transplantation*), en el que los condrocitos autólogos se siembran previamente en un soporte de Col, antes de su implantación sobre la lesión focal (Gomoll y col., 2010; Benthien y Behrens, 2011).

### **1.7.3. Mosaicoplastia**

Una técnica ampliamente utilizada en el tratamiento de lesiones del cartílago articular es la mosaicoplastia. Ésta consiste en la translocación de cilindros osteocondrales, de una zona poco comprometida con la absorción de carga, a la zona afectada (Figura 7 C). Sus limitaciones vienen dadas por el tamaño de la lesión, por la formación de un tejido de reparación fibrocartilaginoso y a la potencial morbilidad en la zona donante (Fuentes-Boquete y col., 2007). Otro gran problema que se ha detectado es la falta de congruencia entre el cilindro osteocondral a implantar y la zona de lesión, afectando a la distribución de las fuerzas de tensión y deformación (Valderrábano y col., 2009).

#### **1.7.4. Desarrollo de sustitutos tisulares**

La ausencia de tratamientos eficientes motiva a los investigadores a desarrollar, mediante IT, sustitutos tisulares biológicos susceptibles de ser implantados para reemplazar la zona de la articulación afectada (Liao y col., 2014; Mesallati y col., 2014) (Figura 7 D). Hoy en día, todavía no está muy extendido el uso de la IT en los procedimientos quirúrgicos, aunque existen muchas combinaciones de células y soportes diferentes que están siendo testadas *in vitro* e *in vivo*.

### **1.8 Ingeniería Tisular**

Existen tres factores clave para la generación de tejidos mediante IT (Figura 7 E): el tipo celular, los factores bioactivos y los soportes o biomateriales (Chan y Leong, 2008; Johnstone y col., 2013; Mobasheri y col., 2014; Wyles y col., 2015).

#### **1.8.1. Tipo celular**

##### **1.8.1.1. Condrocitos y osteoblastos**

Los condrocitos articulares y los osteoblastos son las opciones más obvias para la regeneración de la unidad osteocondral. El empleo de tipos celulares maduros aportan mayor calidad al tejido de reparación (Tritz-Schiavi y col., 2010) pero lleva asociado varios inconvenientes: baja disponibilidad, desdiferenciación (en el caso de los condrocitos) y limitada capacidad de proliferación. Además, se generan grandes defectos en la zona donante para obtener el suficiente número de células para reparar las lesiones (Mao, 2005). Por ello, las investigaciones comenzaron a centrarse en otros tipos celulares, como las CMEs (Facchini y col., 2006), de las que se pueden obtener un mayor número de células y un fenotipo adecuado (Negri y col., 2007).

##### **1.8.1.2. Células mesenquimales estromales**

De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cell Therapy*), las CMEs humanas son células

progenitoras multipotentes no hematopoyéticas, caracterizadas por su adherencia al plástico de los frascos de cultivo, su capacidad de ser expandidas *ex vivo* y la expresión de marcadores de superficie como el complejo de diferenciación (CD) 73 ó ecto5- nucleotidasa, CD90 ó Thy-1 y CD105 ó endoglina (Dominici y col., 2006). Las CMEs son fáciles de obtener y pueden ser aisladas de una gran variedad de tejidos como el adiposo (Zuk y col., 2001), la MO (Pittenger y col., 1999), la membrana amniótica (Díaz-Prado y col., 2011) u otros (Young y col., 2001; Fan y col., 2009; Arufe y col., 2010). Sin embargo, la habilidad para diferenciarse hacia condrocitos difiere dependiendo del tejido del que se obtengan (Inui y col., 2012). Las CMEs-MO tienen un mayor potencial de condrogénesis y osteogénesis que las procedentes de otras fuentes tisulares (Chiang y col., 2011), cuando se someten a los estímulos adecuados (Mobasheri y col., 2014). Este potencial condrogénico se ha relacionado con la expresión de CD105, un receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*TGF $\beta$ , Transforming growth factor  $\beta$* ) (Raghunath y col., 2005).

La condrogénesis de las CMEs es un proceso complejo y ampliamente estudiado. El modelo estándar es un cultivo tridimensional (en micromasa o sobre soportes) en el que se induce la condrogénesis con los estímulos adecuados (Chen y Tuan, 2008). Las CMEs-MO pueden diferenciarse condrogénicamente tanto *in vitro*, cultivadas en medio definido suplementado con factores de crecimiento biológicos específicos, o *in vivo*, mediante implantación directa en la articulación (Chiang y col., 2011). La diferenciación condrogénica de las CMEs está influenciada por la activación de rutas de señalización y factores de transcripción como la región determinante del sexo del cromosoma Y-caja 9 (*SOX9, sex determining region Y-box 9*), una de las moléculas intrínsecas asociadas al fenotipo condrogénico. También, está influenciada por proteínas de la MEC, hormonas, citoquinas, cargas mecánicas y por la tensión parcial de O<sub>2</sub> (Chen y Tuan, 2008).

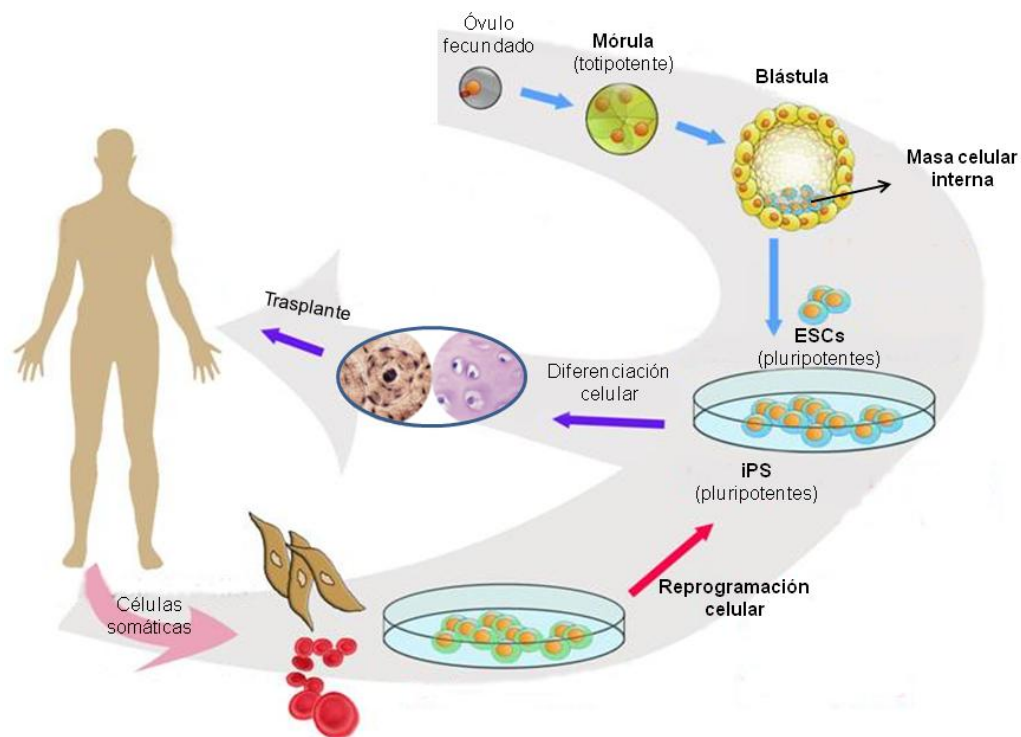
En cuanto a su potencial osteogénico, las CMEs también expresan las proteínas morfogénicas óseas (*BMPs, bone morphogenetic proteins*), así como el factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF, vascular*

*endothelial growth factor*). Ambos factores juegan un papel en la regulación de la reparación del hueso. Las *BMPs* son producidas por las CMEs para estimular de forma autocrina su proliferación y diferenciación ósea. El *VEGF* juega un papel importante en la neo-angiogénesis y puede mejorar la eficacia del proceso reparativo (Gianakos y col., 2016).

Las CMEs-MO son una alternativa a los tipos celulares maduros debido a sus características inmunogénicas, anti-inflamatorias e inmunosupresivas (Chen y Tuan, 2008). Sin embargo, en algunos casos, utilizando CMEs no se mejoran los resultados obtenidos mediante el uso de tipos celulares maduros (Chiang y col., 2011), dando lugar a fibrocartílago o tejido hipertrófico (Wang y col., 2009; Mahmoudifar y Doran, 2010). Además, el aislamiento de CMEs a veces es limitada, sobre todo con el aumento de la edad en la que se ha visto disminución de la proliferación y de la capacidad de diferenciación (Mimeault y Batra, 2009; Inui y col., 2012; Toh y col., 2014). Las células madre pluripotentes son una alternativa con gran potencial en la regeneración tisular.

#### **1.8.1.3. Células pluripotentes inducidas**

Las células madre embrionarias (*ESCs*, *embryonic stem cells*) fueron las primeras células que se aislaron con capacidad pluripotente y con un alto potencial de proliferación (Wei y col., 2012). Estas células son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia cualquier linaje celular, de las tres capas germinales, tras su agregación en cuerpos embrionarios (*EBs*, *embryoid bodies*) (Kuo y col., 2006). Se ha descrito en la literatura que el uso de *ESCs* mejora la reparación del cartílago en modelos animales (Zhang y col., 2016). Sin embargo, establecer líneas de *ESCs* implica la destrucción de embriones y su uso en el ámbito de la investigación y la clínica tiene serias implicaciones éticas (Wei y col., 2012). Este problema se ha visto solventado con la generación de células pluripotentes inducidas (*iPS*, *induced pluripotent stem cells*) (Figura 8).



**Figura 8.** Imagen esquemática de la forma de obtención de las *ESCs* e *iPS* y su posible uso en la IT del cartílago y hueso. Modificada de <http://stemcelloverview.weebly.com/classes-of-stem-cells.html>.

Las *iPS* fueron desarrolladas por Takahashi y Yamanaka y col. (2006 y 2007) a partir de células somáticas adultas, mediante la introducción (mediada por retrovirus) de cuatro factores de transcripción: factor de transcripción de unión a octámeros 4 (*Oct4*, *octamer-binding transcription factor 4*), región determinante del sexo del cromosoma Y-caja 2 (*Sox2*, *sex determining region Y-box 2*), factor similar a *Kruppel* 4 (*Klf4*, *Kruppel-like factor 4*) y el protooncogén *c-myc* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*). Las *iPS* presentan características similares a las de las *ESCs* en cuanto a morfología, proliferación, perfiles de expresión génica, estado epigenético y pluripotencia (Zhao y col., 2013). Desde estos primeros trabajos, se han estudiado diferentes herramientas y tipos celulares de partida para la generación de *iPS* (Álvarez y col., 2012; Zhao y col., 2013).

Aunque los estudios sobre la IT del cartílago utilizando *iPS* todavía son escasos, diversos estudios han descrito el potencial de las *ESCs* e *iPS* en su reparación (Toh y col., 2014) y la del hueso (Lou, 2015). Estas células

presentan pluripotencia y una capacidad ilimitada para autorenovarse, pero tienen un alto potencial tumorigénico (Wolbank y col., 2010). De hecho, algunos estudios han enfatizado el papel de la pre-diferenciación de las células pluripotentes hacia células multipotentes, antes de su uso como terapia (Oldershaw y col., 2010; Liu y col., 2012; Koyama y col., 2013). La pre-diferenciación o derivación de CMEs a partir de *iPS* representa una alternativa prometedora al uso de CMEs de cultivos primarios, ya que se puede obtener un mayor número de células. De este modo también se evitan los problemas de senescencia de las CMEs adultas y la variabilidad del tejido donante (Inui y col., 2012; Toh y col., 2014). Aunque la TC o IT utilizando *iPS* suponen herramientas prometedoras, su uso clínico todavía no está avalado ni por la comunidad científica ni por la legislación internacional vigente, exceptuando a Japón (Cyranoski, 2014).

### 1.8.2. Factores bioactivos

Los miembros de la superfamilia del *TGFβ*, como el *TGFβ1* y *β3*, o la proteína *BMP2* son los más utilizados en la IT osteocondral, debido a su papel en el mantenimiento en la homeostasis del hueso y su capacidad de inducción de condrogénesis (Zscharnack y col., 2010; Bian y col., 2011; Demoor y col., 2014; Zhen y Cao, 2014). Otros factores, como el factor de crecimiento insulínico (*IGF*, *insuline-like growth factor*), han mostrado efectos sinérgicos a los del *TGFβ* en cuanto a condrogénesis de CMEs. Sin embargo, otros factores como el factor de crecimiento fibroblástico básico (*bFGF*, *basic fibroblast growth factor*) han mostrado efectos inhibitorios sobre la capacidad de diferenciación de las CMEs (Raghunath y col., 2005).

La diferenciación hacia cartílago se ha inducido con morfógenos tales como la *BMP2* ó la *4* (Kirn-Safran y col., 2004) o más ampliamente se ha utilizado el *TGFβ3* (Kock y col., 2012), aunque se ha descrito que el uso de estos factores no evita la hipertrofia (Weiss y col., 2010). La hipertrofia se clasifica como un estado tardío post-mitótico de la diferenciación condrogénica. Está caracterizada por un incremento en el volumen celular de los condrocitos individuales, producción de Col X y metaloproteasa de matriz 13 (*MMP13*, *Matrix metaloprotease 13*) y una disminución en la síntesis de Col II (Weiss y col., 2010). La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (*PTHrP*,

*parathyroid hormone-related protein*) reprime la diferenciación terminal, inhibiendo la maduración del condrocito, manteniéndolo en un estado pre-hipertrófico (Harrington y col., 2004; Kim y col., 2008; Weiss y col., 2010), aunque también es un potente inhibidor de la condrogénesis temprana (Weiss y col., 2010).

### 1.8.3. Soportes o biomateriales

Los soportes o biomateriales son matrices porosas que permiten el transporte de las células al lugar de la lesión (Gloria y col., 2010; Sharma y col., 2014). Además, proveen un ambiente tridimensional adecuado para las interacciones celulares, lo cual las estimula para sintetizar MEC, mantener su fenotipo y, así, poder restaurar la función del tejido nativo (Bosnakovski y col., 2006; Kock y col., 2012).

#### 1.8.3.1. Propiedades de los soportes

El soporte debe permitir la migración, la adhesión y el crecimiento celular y su estructura debe de soportar la organización del tejido en crecimiento (Baino y col., 2015). Para ello, las principales características que debe presentar un soporte son:

- **Biocompatibilidad.** Un soporte no debe producir en los tejidos vivos respuestas tóxicas, nocivas, cancerígenas o inmunológicas, ya sean de tipo inflamatorio o de rechazo (Niknejad y col., 2008).
- **Biodegradabilidad.** El biomaterial debe proveer temporalmente una estructura que permita a las células sintetizar la MEC, pero a su vez, debe de ser sustituido por el neot Tejido en formación (Gloria y col., 2010; Demoor y col., 2014; Gomoll y Minas, 2014). Tampoco debe de biodegradarse en productos tóxicos.
- **Porosidad.** La presencia de poros y su interconectividad es esencial para el transporte de nutrientes y gases, al menos en el cultivo *in vitro*.
- **Estabilidad mecánica adecuada.** La resistencia mecánica del soporte es necesaria cuando se implanta *in vivo*. Esta estabilidad va a depender del tipo de soporte (ejemplos: estructuras fibrosas, esponjas porosas o hidrogeles) y de su composición (Kuo y col., 2006).



**1.8.3.2. Composición de los soportes**

Los soportes pueden ser sustratos naturales, sintéticos o una combinación de ambos.

Entre los biomateriales naturales, los más utilizados en Ingeniería del cartílago son la fibrina, la agarosa, el alginato, el Col, el quitosano y el AH. Los soportes sintéticos presentan mejores cualidades bioquímicas y biomecánicas, ya que son más fácilmente modificables que los materiales naturales (Raghunath y col., 2005). Sin embargo, los materiales sintéticos pueden producir reacciones adversas en el lugar del implante. Entre los soportes sintéticos, los más utilizados son los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres como el ácido poliláctico (*PLA, polylactic acid*) y el ácido poli láctico-co-glicólico (*PLGA, poly lactic-co-glycolic acid*) y otros polímeros como el polietilenglicol (PEG), la policaprolactona (PCL) o la fibra de carbono (Chiang y Jiang, 2009).

En cuanto a la IT del hueso, los materiales más utilizados comúnmente son el fosfato cálcico, HA,  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -FTC) o mezclas bifásicas como *PLGA*/ $\beta$ -FTC (Jiang y col., 2007; Liao y col., 2007; Gómez-Barrena y col., 2011). Algunos soportes poseen efecto osteoconductor en las CMEs, como la HA (Toh y col., 2014) o el  $\beta$ -FTC (Suárez-González y col., 2014) que imitan al componente inorgánico del hueso (Gloria y col., 2010).

**1.8.3.3. Biomateriales de colágeno**

Las esponjas de Col son soportes naturales que se han considerado como biomateriales adecuados para la IT del cartílago y del hueso (Schulz y col., 2008; Tortelli y Cancedda, 2009; Zscharnack y col., 2010; Claus y col., 2012; Xu y col., 2012) por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de promover la adhesión y proliferación celular (Polo-Corrales y col., 2014). Los dominios conservados de la proteína de Col hacen que las células puedan interactuar con Col de otras especies (Wong y col., 2010). Aunque se ha descrito que el Col I estimula la proliferación celular e induce la condrogénesis, además de la osteogénesis, es el Col II el que estimula y mantiene el fenotipo condrogénico con mayor efectividad (Bosnakovski y col., 2006; Wong y col., 2010). Sin embargo, el inconveniente del uso del Col

como soporte es su pobre resistencia mecánica. Para superar la debilidad inherente de las esponjas de Col, se han combinado con otros materiales para incrementar la resistencia a la compresión, *in vitro* e *in vivo* (Tortelli y Cancedda, 2009). Por ello, y también para mejorar la viabilidad celular, los biomateriales de Col se han suplementado con otros componentes típicos de la MEC (Chan y Leong, 2008), incluyendo soportes que combinan Col y GAGs (Jin y col., 2007; Keogh y col., 2010) o heparán sulfato (HS) y PGs (Kirn-Safran y col., 2004). Se ha descrito que los PGs están implicados en la diferenciación del condrocito, a través de interacciones con numerosas moléculas condroreguladoras (Kirn-Safran y col., 2004). Moléculas como el HS han mostrado que aumentan la diferenciación y auto-renovación de CMEs-MO (Toh y col., 2014), puesto que coordinan rutas de señalización durante la condrogénesis (Kirn-Safran y col., 2004).

## **1.9. Modelos de reparación osteocondrales *in vitro* e *in vivo***

Para el uso de implantes tisulares generados mediante IT, no sólo se ha de identificar la combinación tipo celular/soporte más idónea, si no que se ha de tener en cuenta la integración del neot Tejido con el tejido nativo, y el papel de las células presentes en él (De Vries-Van Melle y col., 2012).

### **1.9.1. Modelos de reparación de cartílago articular *in vitro***

Tanto *in vitro* como *in vivo*, las interacciones físicas entre CMEs y los tipos celulares circundantes inducen eventos de señalización, señales bioquímicas y físicas en dosis, secuencia y duración similar a las fisiológicas, que auto-promueven la diferenciación (Cooke y col., 2011). Este tipo de interacciones no se obtienen en cultivos en monocapa, por lo que es necesario desarrollar modelos en una estructura tridimensional. Un modelo *in vitro* provee mayor complejidad que un cultivo celular y, a su vez, es menos complejo y costoso, y más estandarizado que un modelo animal (Zhang y col., 2005; De Vries-Van Melle y col., 2012).

Los problemas de la IT del hueso son la dificultad para obtener *in vitro* una distribución homogénea de los nutrientes y el O<sub>2</sub>, (Tortelli y Cancedda, 2009)

y las limitaciones en la capacidad de vascularización del neot Tejido (Paschos y col., 2015). Por otra parte, los grandes problemas de la IT del cartílago *in vitro* son la hipertrofia celular (Cooke y col., 2011) y la falta de compresión dinámica que influencia fuertemente los patrones de deposición de los PGs, secretados por las células (Tortelli y Cancedda, 2009). Todos estos problemas sólo se asocian a los estudios *in vitro* y, por ello, son interesantes los estudios pre-clínicos mediante modelos animales. Cualquier estrategia encaminada a tratar de reparar el daño tisular ha de ser validada en modelos animales antes de realizar ensayos clínicos en humanos (Rentsch y col., 2010; Endres y col., 2012).

Existen evidencias de que tejidos condrogénicos generados *in vitro* que presentan fenotipo inmaduro, una vez que se implantan dentro de una articulación muestran un fenotipo más maduro. De hecho, algunos autores han descrito que cuanto más maduro es el tejido condrogénico a implantar, existe una menor capacidad de integración con el cartílago circundante. Sin embargo, esto no se ha considerado un problema debido al uso rutinario de suturas o pegamentos tisulares en cirugía (Pabbruwe y col., 2009). Otras herramientas testadas para mejorar la integración durante la reparación del cartílago son la administración local de factores de crecimiento, el pre-tratamiento de la superficie articular nativa con enzimas proteolíticas (Zhang y col., 2005) o el uso de citoquinas catabólicas como la interleuquina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) (Khan y col., 2011).

### **1.9.2. Modelos de reparación osteocondral *in vivo*: el modelo ovino**

La mayor parte de los estudios para la reparación del cartílago o hueso *in vivo* se han realizado en modelos animales pequeños (Zscharnack y col., 2010) que presentan disimilitudes en mecanismos de reparación, tamaño y estructura, con los humanos (McCarty y col., 2009).

Existen diferencias en los mecanismos de reparación, puesto que se ha visto reparación espontánea en lesiones osteocondrales en diferentes especies, como el conejo. También se han detectado reparaciones espontáneas en lesiones condrales en especímenes jóvenes de animales de mayor tamaño (Mizuta y col., 2006; Jones y McGonagle, 2008).

Se ha descrito que el grosor del cartílago varía entre especies, siendo más delgado el de conejo, seguido de la oveja, el caballo y por último el humano. En cuanto al tejido óseo, las diferentes especies muestran mayor densidad mineral en el hueso subcondral y un hueso trabecular más fino (Chevrier y col., 2015), características que se asociarían en humanos a un estado patológico como la OA. Otra característica que se asocia a un estado patológico en humanos es la presencia de grupos isogénicos de condrocitos que, sin embargo, en el cartílago ovino es frecuente encontrar.

El cartílago ovino presenta otras diferencias con el cartílago humano como la ausencia de distribución zonal de condrocitos y componentes de la MEC (Mainil-Varlet y col., 2010; Endres y col., 2012). Sin embargo, los estudios pre-clínicos en investigación ortopédica utilizando a la oveja como animal experimental de gran tamaño continúan haciéndose populares. Ésto es debido a la similitud con el ser humano en el soporte del peso corporal, estructura articular y procesos de regeneración de hueso y cartílago (McCarty y col., 2009; Rentsch y col., 2010; Adamzyk y col., 2013). El modelo ovino, además, posibilita el seguimiento de la evolución de procesos lentos de cicatrización (Atayde y col., 2014). A pesar de que el modelo ovino es cada vez más utilizado para testar IT osteocondral, utilizando condrocitos y CMEs-MO ovinas (oCMEs-MO), existe muy poca bibliografía sobre la caracterización de las oCMEs-MO (Mrugala y col., 2008; Mccarty y col., 2009). Esto se debe a que se aíslan las células de los aspirados medulares, siguiendo los protocolos establecidos para humanos y no se caracterizan porque se da por hecho que se tratan de CMEs.

### **1.9.3. Escalas de evaluación histológica de la reparación osteocondral**

Uno de los grandes desafíos de la artrología ha sido desarrollar y validar escalas de medición, útiles en el diagnóstico y tratamiento de las patologías. Desde el año 1949, se han desarrollado diferentes escalas semi-cuantitativas de evaluación macroscópica de la reparación del cartílago (Rutgers y col., 2010). Algunas escalas, como la desarrollada por Mankin y col. (1971), se centran en cuantificar la severidad de la OA pero no evalúan el proceso natural de reparación (Pineda y col., 1992). Debido a la controversia sobre la eficacia de los tratamientos y que en los estudios la

calidad de la metodología es baja, es necesario compararlos con un sistema uniforme y fiable (Van Den Borne y col., 2007). Aún cuando estas escalas tienen errores subjetivos, proveen un valor relativo numérico que permite la comparación entre grupos experimentales durante la evaluación de diferentes intervenciones terapéuticas (Pineda y col., 1992).

En la actualidad, existen diferentes escalas de evaluación histológica para determinar la naturaleza del neot Tejido formado en modelos de reparación *in vivo*. Una de las primeras escalas utilizadas es la de *O'Driscoll* (*O'Driscoll* y col., 1986), la cual evalúa de forma completa rasgos del cartílago. Otra escala es la *ICRS*, una escala macroscópica visual que sólo evalúa tres criterios del neot Tejido (grado de reparación, integración con el tejido nativo y apariencia macroscópica) y concluye con una valoración general (Brittberg y Peterson, 1998). La escala *ICRS II* surge como una combinación entre la *O'Driscoll* y la *ICRS*, para medir el tejido de reparación osteocondral (Mainil-Varlet y col., 2010). Ésta presenta parámetros histológicos que tienen en cuenta el Col y los PGs de la MEC, la morfología celular, la superficie articular, la integración del tejido, además de otros parámetros que implican al hueso subcondral y una valoración general final (Mainil-Varlet y col., 2010).

Sin embargo, ninguna de estas escalas está destinada para su uso en modelos de reparación *in vitro*.



## **CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---





Las lesiones, tanto en el cartílago como en el hueso subcondral, pueden dar lugar a una OA secundaria debido a la desestabilización de la articulación. Por ello, es importante encontrar un método eficaz para reparar esas lesiones antes de que se desencadene la OA.

Muchos tratamientos han sido propuestos para curar lesiones focales, o la degeneración artrósica, como los tratamientos quirúrgicos o quirúrgicos combinados con la TC. Sin embargo, estos tratamientos fracasan, sobre todo a largo plazo, debido a que no se genera un tejido adecuado o no se estabiliza mecánicamente la articulación. En los últimos años ha surgido la IT como una herramienta más eficaz, y controlada, para generar sustitutos tisulares. Sin embargo, hasta la fecha no existe el tratamiento definitivo.

Los soportes de Col y PGs son ampliamente utilizados, tanto en la Ingeniería del hueso como del cartílago, y los de  $\beta$ -FTC en la del hueso. Ambos tipos de materiales presentan buenas propiedades biológicas, son de fácil obtención y presentan un coste bajo.

Muchos experimentos de IT han fracasado debido a que el neotejido que se forma es fibrocartílago, con peores propiedades mecánicas que el cartílago hialino. Otro factor que influye en el fracaso de la formación del neotejido es la inadecuación de la combinación del soporte y del tipo celular. Por ello, en primer lugar, es necesario testar la capacidad de las células de formar *in vitro* un neotejido, en los soportes; también, es necesario testar el tipo celular adecuado; y, por último, ha de testarse *in vivo*, en un modelo animal cuyos resultados sean extrapolables a los humanos.

Así, nos planteamos tres hipótesis:

- **Los constructos de CMEs-MO humanas sembradas sobre biomateriales de Col y PGs, son una herramienta útil en la reparación de lesiones focales condrales.**
- **Las células oCMEs-MO son útiles en la reparación osteocondral y su funcionalidad es extrapolable a la humana.**
- **Es posible obtener un tipo celular alternativo para la Ingeniería osteocondral, a partir de iPS.**

Los objetivos que nos proponemos con el fin de dar respuesta a estas hipótesis son los siguientes:

**Objetivo 1:** Analizar la utilidad de las CMEs-MO en la Ingeniería del cartílago.

- 1.1. Obtener y caracterizar CMEs obtenidas a partir de MO humana.
- 1.2. Analizar la capacidad condrogénica de las CMEs-MO humanas cultivadas sobre soportes de Col y PGs.
- 1.3. Analizar la capacidad de las CMEs-MO humanas de reparar lesiones de cartílago articular en un modelo *in vitro*.
- 1.4. Analizar la influencia de la IL1 $\beta$  en la integración de un neot Tejido en un modelo de lesión de cartílago articular *in vitro*.

**Objetivo 2:** Analizar la utilidad de las oCMEs-MO en la Ingeniería del cartílago y del hueso.

- 2.1. Obtener y caracterizar oCMEs obtenidas a partir de MO ovina.
- 2.2. Analizar la capacidad osteogénica de las oCMEs-MO cultivadas sobre soportes de Col I y  $\beta$ -FTC.
- 2.3. Analizar la capacidad de las oCMEs-MO de reparar lesiones de cartílago articular ovino en un modelo *in vitro*.

**Objetivo 3:** Analizar la utilidad de las células simiales a CMEs (CSMEs), generadas a partir de *iPS*, en la Ingeniería del cartílago y el hueso.

- 3.1. Obtener y caracterizar las CSMEs obtenidas a partir de *iPS*, en comparación con las CMEs.
- 3.2. Estudiar la influencia de la diferenciación hacia CSMEs de forma pseudoclona (C-CSMEs) y no clona (NC-CSMEs), en la condrogénesis y osteogénesis.

## **CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### 3.1. Aislamiento y cultivo celular

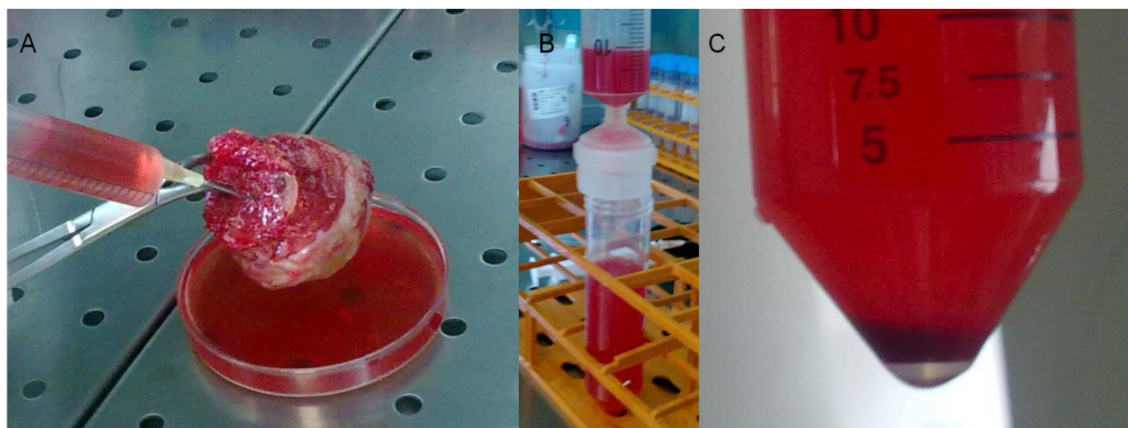
El estudio con muestras de MO y cartílago humanos, fue aprobado por el Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (CAEIG) y cada donante incorporado en este estudio firmó el consentimiento informado (ANEXO I). Las muestras de MO procedieron del Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario Universitario da Coruña (CHUAC). Los donantes no fueron seleccionados y las muestras se procesaron por orden de entrada al laboratorio.

El estudio con muestras de MO y cartílago ovinos, fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del CHUAC (ANEXO II).

Las CMEs de tejido adiposo (CMEs-TA) e *iPS*, fueron proporcionadas por el grupo del Dr. Ángel Raya, *Stem Cell of Pluripotency*, del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC).

#### 3.1.1. Aislamiento y cultivo de las células procedentes de la médula ósea humana

Las muestras de MO utilizadas para aislar las CMEs humanas fueron obtenidas de 24 pacientes (media de edad  $73 \pm 5$  años) que se sometieron a cirugía de reposición debido a OA o a fractura. El conjunto celular fue extraído mediante lavados de la MO (Figura 9 A) inyectando, con una jeringa de 20 ml (Kendall, Turquía) y una aguja de bisel ancho *BD Microlance™* (BD Medical, EE.UU.), medio de *Eagle* con modificación de *Dulbecco* (*DMEM*, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Lonza, España) con un 5% de suero bovino fetal (SBF; *LabClinics*, España) y con 1% de penicilina/estreptomicina (P/E; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, España) (*DMEM5%*). El medio obtenido, con las células en suspensión, se hizo pasar por un filtro de *nylon* de 41µm de tamaño de poro (Millipore, Irlanda) (Figura 9 B). El filtrado se centrifugó durante 10 min a 300xg, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular (Figura 9 C) se resuspendió en *DMEM* al 20% de SBF con 1% P/E (*DMEM20%*).

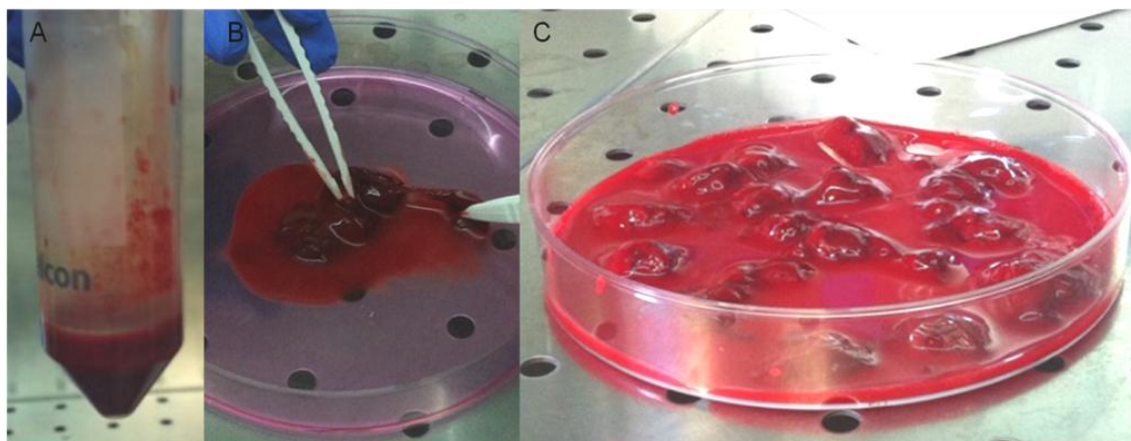


**Figura 9.** Extracción de células de la MO de la cabeza femoral humana. A) Lavado de la MO mediante inyecciones con medio. B) Filtrado de la suspensión obtenida. C) El precipitado celular obtenido tras la centrifugación del filtrado.

Las células aisladas se cultivaron en *DMEM*20%, en frascos de cultivo adherentes (*Costar Corning Inc.*, EE.UU.), a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 48 h, se realizó un lavado con suero salino (*Fresenius Kabi*, España) para eliminar las células no adherentes y se reemplazó el medio de cultivo. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se realizaron subcultivos celulares mediante disociación con tripsina-ácido etilen diamino tetraacético (*EDTA*, *Ethylene diamine tetraacetic acid*; *Sigma-Aldrich*, España). En los dos primeros subcultivos celulares se realizó la técnica de *pre-plating* (Richler y Yaffe, 1970), que consiste en inactivar la tripsina con suero y esperar a que fibroblastos y macrófagos, con mayor capacidad de adherencia que las CMEs, se adhieran al fondo del frasco de cultivo. Tras 15 min, se recogió la suspensión, se centrifugó 10 min a 300xg y se resembró el precipitado en *DMEM*20%.

### 3.1.2. Aislamiento y cultivo de células procedentes de la médula ósea ovina

Los aspirados de cresta ilíaca, procedentes de seis especímenes de oveja doméstica (*Ovis Aries*), se obtuvieron con una aguja para biopsias de MO (*Ranfac*, EE.UU.) y se depositaron en tubos Falcon de 50 ml (*Costar Corning Inc.*) (Figura 10 A).



**Figura 10.** Extracción de células del aspirado de médula ovina. A) Aspirado de cresta iliaca. B y C) El coágulo del aspirado de médula se troceó y esparció sobre una placa adherente.

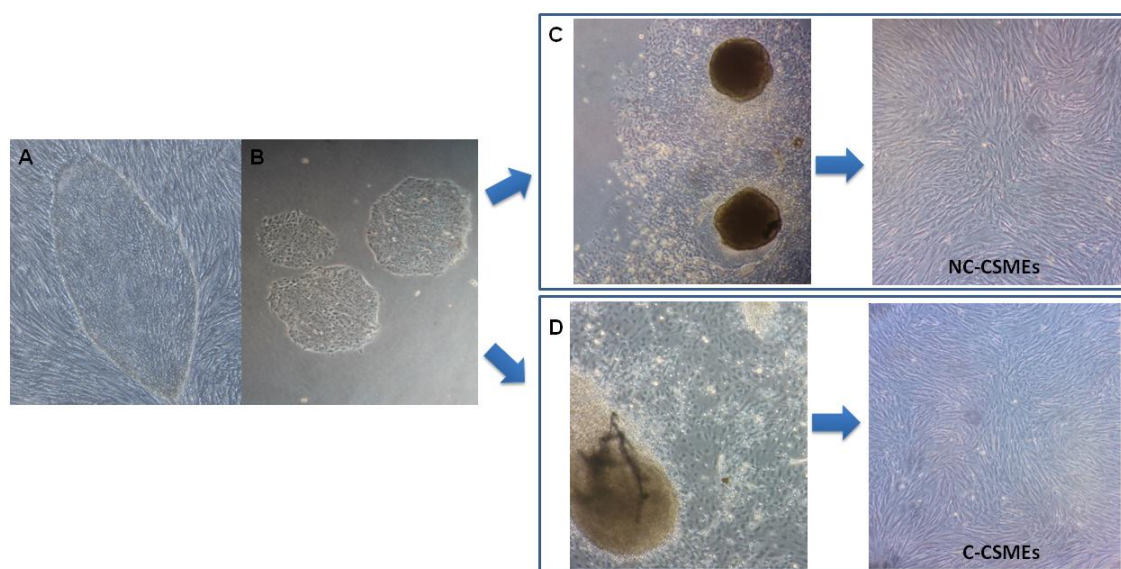
Al aspirado de médula se le añadió *DMEM*5% y se centrifugó durante 10 min a 300xg. Se descartó el sobrenadante y el coágulo formado se troceó con unas pinzas sobre una placa adherente de cultivo (*Costar Corning Inc.*) (Figura 10 B y C). Se le añadió *DMEM*20% a los coágulos y se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 48 h, las placas se lavaron con suero salino para eliminar las células no adherentes y los coágulos. Se realizaron cambios de medio cada 3-4 días. Cuando la confluencia celular se aproximó al 80% se realizó la técnica de *pre-plating* y las células se subcultivaron.

### 3.1.3. Aislamiento y cultivo de células derivadas de células pluripotentes inducidas

Las CMEs-TA se mantuvieron en medio para *EBs* (*mEBs*), consistente en medio de *Dulbecco* modificado de *Eagle* de *knockout* (*KO-DMEM*, *KnockOut-Dulbecco's modified Eagle medium*; *Gibco*) con 10% de SBF (*Hyclone-GE Healthcare*, EE.UU.), 2 mM *Glutamax*<sup>TM</sup> (*Glx*, *Gibco*), 50 mM 2-beta-mercaptoetanol (*Gibco*), 1% aminoácidos no esenciales (*NEAA*, *non-essential amino acids*; *Gibco*) y 1% P/E.

Las *iPS* se cultivaron en medio para *ESCs* (*mESCs*) consistente en *KO-DMEM* con 20% suero *KnockOut* (*KO-SR*, *Gibco*), 2mM *Glx*, 50 mM 2-beta-mercaptoetanol, 1% *NEAA*, 1% P/E y 10 ng/ml *bFGF* (*Peprotech*, EE.UU.). Los cultivos de *iPS* se mantuvieron sobre una capa de fibroblastos irradiados, a

modo de células alimentadoras (*feeders*) (Figura 11 A), a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>, con cambios de medio diarios. En dos pases diferentes, las colonias se levantaron manualmente y se adaptaron (es decir, se crecieron sin *feeders*) a placas recubiertas de *Matrigel*<sup>TM</sup> (BD Biosciences, EE.UU.) (Figura 11 B), con medio condicionado obtenido del sobrenadante del cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón en *mESCs*, con 10 ng/ml de *bFGF*.



**Figura 11.** Derivación de *iPS* hacia células similares a CMEs (CSMEs). A) Colonias de *iPS* sobre *feeders*. B) Colonias de *iPS* adaptadas a *Matrigel*. C) Grupos de *EBs* sembrados en conjunto para diferenciar hacia CSMEs no clonales (NC-CSMEs). D) *EBs* sembrados de forma independiente para diferenciar hacia CSMEs pseudo-clonales (C-CSMEs).

Las colonias pluripotentes sembradas en placas de *Matrigel*<sup>TM</sup> se disociaron y se centrifugaron 10 min a 800xg, en placas de 96 pocillos con fondo en “V” (*Costar Corning Inc.*), para la formación de *EBs*. Tras 24 h, los *EBs* se cultivaron en *mEBs* en placas de cultivo no adherentes (*Costar Corning Inc.*) para formar agregados. Los *EBs*, tras dos días en suspensión, se sembraron en placas de seis pocillos (*Costar Corning Inc.*) recubiertas con *EmbryoMax*<sup>®</sup> (*Millipore*); se cultivaron hasta que las células proliferaron de los *EBs* (Figura 11 C) y alcanzaron la confluencia. Las células se subcultivaron para obtener una monocapa homogénea de células similares a CMEs (CSMEs), en este caso no-clonales (NC-CSMEs).



Para evitar problemas debido a la heterogeneidad celular, se estableció un método de derivación, en el cual cada *EB* se sembró de forma independiente (Figura 11 D) en pocillos de una placa de 24 pocillos (*Costar Corning Inc.*) recubiertos de *EmbryoMax*<sup>®</sup>. Cada *EB* se expandió clonalmente hasta obtener una monocapa homogénea de CSMEs pseudo-clonales (C-CSMEs).

## 3.2. Caracterización celular

### 3.2.1. Caracterización de las células procedentes de médula ósea humana y ovina

Las células humanas y ovinas, tras 3-8 subcultivos, se tripsinizaron y contaron para proceder a su caracterización fenotípica mediante citometría de flujo y diferenciación multilínea. La caracterización para confirmar su identidad se realizó siguiendo los estándares establecidos, para CMEs humanas, por la *ISCT* (Dominici y col., 2006).

#### 3.2.1.1. Análisis de la expresión de marcadores de superficie en células procedentes de médula ósea humana y ovina

Se realizó el análisis de expresión de marcadores de superficie característicos de CMEs humanas (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD166 y CD271), de células hematopoyéticas (CD34 y CD45) y de células embrionarias (*STRO-1* y *SSEA-4*) (Tabla 1). Además, en el caso de las células ovinas se testaron anticuerpos (Ac) CD44 anti-oveja y CD45 anti-rata.

Las células se resuspendieron en tampón *Fluorescence Activated Cell Sorting* (*FACS*; BD Biosciences) y se introdujeron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos *NUNC*<sup>TM</sup> (*VWR International*, Dinamarca). La placa se centrifugó 10 min a 300xg, se eliminó el sobrenadante y se añadieron los Ac primarios para cada marcador, en diferentes pocillos, siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales (Tabla 1). Tras 40 min de incubación a 4°C en oscuridad, se realizaron dos lavados con tampón *FACS* junto con dos centrifugaciones. Se realizó una segunda incubación de 30 min a 4°C en oscuridad en aquellos pocillos en los que era necesaria la adición del Ac secundario policlonal para

inmunoglobulina de ratón desarrollado en conejo y marcado con isotiocianato de fluoresceína (*FITC*, *fluorescein isothiocyanate*; *Dako*, EE.UU.). Se realizaron otros dos lavados con *FACS* y se traspasaron las células a tubos de citometría. Al menos  $1 \times 10^4$  eventos celulares se adquirieron de cada condición, utilizando un citómetro de flujo *FACSCalibur* (*BD Biosciences*). Los resultados obtenidos se procesaron utilizando el programa *CellQuest* (*BD Biosciences*).

	Ac	Clon	Especificidad	Casa Comercial		Ac	Fluorocromo	Clon	Especificidad	Casa Comercial
ISOTIPOS	<i>FITC</i> Ratón IgG1 Kappa Isotipo Control	MOPC-21		<i>BD Pharmingen™</i>	AC PRIMARIOS MARCADOS	Anti-Humano CD29 monoclonal	<i>PE</i>	TS2/16	Integrina $\beta 1$	<i>BioLegend</i>
	PE Ratón IgG1 Kappa Isotipo Control	MOPC-21		<i>BD Pharmingen™</i>		Ratón Anti-Humano CD34 monoclonal	<i>PE</i>	581	Antígeno de célula progenitora hematopoyética o de célula endotelial ( <i>HPCA1</i> )	<i>BD Pharmingen™</i>
	PECy5 Ratón IgG1 Isotipo Control	1F8		<i>Abcam</i>		CD44 Anti-Humano	<i>FITC</i>	IM7	Molécula de adhesión celular asociada al anidamiento y la movilización ( <i>HCAM</i> )	<i>BD Pharmingen™</i>
	Conejo anti-ratón Inmunoglobulinas/ <i>FITC</i>			<i>DAKO</i>		Ratón Anti-Oveja CD44 monoclonal	<i>FITC</i>	25.32		<i>AbD Serotec</i>
AC PRIMARIOS NO MARCADOS						CD45 Anti-humano	<i>FITC</i>	HI30		<i>BD Pharmingen™</i>
	Ratón Anti-Humano CD69 monoclonal	FN50	Antígeno de activación temprana	<i>BD Pharmingen™</i>		Ratón Anti-Rata CD45 monoclonal	<i>FITC</i>	OX-33	Antígeno leucocitario común ( <i>LCA</i> )	<i>BD Pharmingen™</i>
	Ratón Anti-Humano CD271 monoclonal	ME20.4	Receptor del factor de crecimiento nervioso ( <i>NGFR p75</i> )	<i>Sigma-Aldrich</i>		Ratón Anti-Humano CD73 monoclonal	<i>PE</i>	AD2	Ecto5-nucleotidasa	<i>BD Pharmingen™</i>
	Ratón Anti-Humano <i>SSEA-4</i> monoclonal	MC-813-70	Antígeno embrionario estado-específico 4 ( <i>SSEA-4</i> )	<i>R&amp;D Systems</i>		Ratón Anti-Humano CD90 monoclonal	<i>PE-Cy5</i>	5E10	Glicoproteína de membrana <i>Thy-1</i>	<i>BD Pharmingen™</i>
	Ratón Anti-Humano <i>STRO-1</i>	NS1-Ag4-1	Antígeno estromal 1 ( <i>STRO-1</i> )	<i>Development. Studies Hybridoma Bank</i>		Ratón Anti-Humano CD105 monoclonal	<i>FITC</i>	SN6	Endoglina, <i>SH2</i>	<i>AbD Serotec</i>
	Anti-Fibroblasto humano	1B10	Antígeno específico de fibroblasto	<i>Sigma-Aldrich</i>		Ratón Anti-Humano CD106 monoclonal	<i>PE-Cy5</i>	51-10C9	Molécula de adhesión vascular 1 ( <i>VCAM-1</i> )	<i>BD Pharmingen™</i>
AC SECUNDARIO						Ratón Anti-Humano CD166 monoclonal	<i>PE</i>	3A6	Molécula de adhesión celular activada por leucocitos ( <i>ALCAM</i> )	<i>Immunostep</i>
	Conejo Anti-Ratón Inmunoglobulinas/ <i>FITC</i>			<i>DAKO</i>						

**Tabla 1.** Ac utilizados en la citometría de flujo, para la caracterización de los marcadores de superficie expresados por las CMEs humanas y ovinas. *PE*, ficoeritrina (*phycoerythrin*); *PECy5*, ficoeritrina con cianina 5 (*phycoerythrin with cyanin-5*); *FITC*, isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*).

Los resultados se expresaron como el porcentaje positivo medio  $\pm$  error estándar (E.E.). La expresión de los marcadores de superficie celular se consideró positiva sólo cuando la presencia en la población fue superior al 2,5%.

### **3.2.1.2. Capacidad de diferenciación multipotente in vitro de las células procedentes de médula ósea humana y ovina**

En el caso de las células humanas, se realizó una agrupación celular con células de siete donantes para la diferenciación multipotente y en el caso de la oveja, se utilizaron células de tres especímenes de forma independiente. Estas células se cultivaron en diferentes medios específicos, para favorecer su diferenciación hacia tres linajes mesenquimales diferentes: adipogénico, osteogénico y condrogénico. La diferenciación hacia los tres linajes se comparó con un control de células sin estimular, cultivadas en *DMEM*20%. Además, las diferenciaciones de las células ovinas se compararon con controles de células a día 0 de diferenciación.

Todas las diferenciaciones se realizaron por duplicado y se evaluaron mediante histología e inmunohistoquímica. También se realizaron estudios de biología molecular, en los que los análisis de expresión en células humanas se normalizaron frente al gen de la proteína de unión a caja TATA (*TBP*, *TATA binding protein*) y en células ovinas al gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (Tabla 2 A).

- **Estimulación adipogénica.** Para testar histológicamente la diferenciación adipogénica, se sembraron  $33 \times 10^3$  células humanas/pocillo en una cámara de ocho pocillos para microscopía (*BD Falcon*, EE.UU.) y  $5 \times 10^3$  células ovinas/pocillo en una cámara de tres pocillos (*BD Falcon*). Las células se cultivaron en monocapa con el medio adipogénico comercial *hMSC Bullekit Adipogenic Differentiation<sup>TM</sup> Medium* (Lonza), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, realizando cambios de medio cada dos o tres días. En el cultivo de células ovinas, al medio adipogénico se le añadió 1 mg/ml de rosiglitazona (*Sigma-Aldrich*). Tras 21 días de diferenciación, se eliminó el medio, tanto de los pocillos estimulados como de los pocillos control, se

lavarón con suero salino y se fijaron con formaldehído al 4% (Panreac Química S.A., España). Se realizó una tinción con *Oil Red O* (Sigma-Aldrich), que permite valorar la presencia de vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas mediante coloración rojo-naranja. La tinción se observó en un microscopio *Olympus BX61* (Olympus, Alemania), equipado con una cámara digital *Olympus DP70* (Olympus).

A	Cebadores	Secuencia <i>F</i> (forward)	Secuencia <i>R</i> (reverse)
CMes	<i>TBP*</i>	5' GCCCATAGTGATCTTGCAGT 3'	5' CGCTGGAACCTCGTCTCACTA 3'
	<i>SOX 9</i>	5' GTACCCGCACTTGACAAC 3'	5' TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC 3'
	<i>COL2</i>	5' GTGTCAGGGCCAGGATGT 3'	5' TCCCAGTGTACAGACACAGAT 3'
	<i>AGG</i>	5' GCCTACGAAGCAGGCTATGA 3'	5' GCACGCCATAGGTCCTGA 3'
	<i>COL1</i>	5' GTGATGCTGGTCTGTTGGT 3'	5' CACCATCGTGAGCCTTCTCT 3'
	<i>COL10</i>	5' CACCTTCTGCACTGCTCATC 3'	5' GGCAGCATATTCTCAGATGGA 3'
	<i>FABP4</i>	5' GGATGATAAACTGGTGGTGA 3'	5' CACAGAAATGTTGATAGTTCAATGC 3'
	<i>ADPN</i>	5' GGTGAGAAAGGAGATCCAGGT 3'	5' TGCTGAGCGGTATACATAGGC 3'
	<i>LPL</i>	5' AGAACATCCCATTCACTCTGC 3'	5' CCATTTGAGCTTCAACATGAGT 3'
	<i>ALP</i>	5' GACGGACCCGTCCTCTC 3'	5' GTGCCCCGTGGTCAATTCT 3'
	<i>OP</i>	5' CGCAGACCTGACATCCAGT 3'	5' GGCTGTCCCAATCAGAAGG 3'
oCMes	<i>GAPDH*</i>	5' ATCCTGCCAACATCAAGTGG 3'	5' CAGCCTTCTCCATGGTAGTGA 3'
	<i>VIM</i>	5' ACATCGAGATCGCCACCTAC 3'	5' TTGGTTTCCCTCAGGTTTCAG 3'
	<i>SOX2</i>	5' CGAGGGAATGGACCTGTATAG 3'	5' CTGCAAAGCTCCTACCGTATC 3'
	<i>AGG</i>	5' TTTGGACTTTGGCAGAATACC 3'	5' AATCCAGAAGGAAGACCACTTG 3'
	<i>COL2</i>	5' GGGCGAGACTGTGATTGAGT 3'	5' GACAGGCCCTATGTCCACAC 3'
	<i>COL1</i>	5' CCTGGATGCCATTAAGGTCT 3'	5' TCTTGCTTGTCTCTGTGCTG 3'
	<i>LPL</i>	5' TGAAGCTTGGCAAAGCTACAGA 3'	5' GGCGTCTTTTGTAAAAGTTACCTCAT 3'
	<i>FABP4</i>	5' GGATGTGGTCAACATTAAATCAGA 3'	5' TGTCATCTGGAGTGACTTCATCA 3'
	<i>OP</i>	5' GCAGTCCTCACTGTCAACAAGA 3'	5' TGCTGTGGAATTAGCAGTCG 3'
B	Cebadores	Secuencia <i>F</i> (forward)	Secuencia <i>R</i> (reverse)
CSMes	<i>GAPDH*</i>	5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 3'	5' AGGGATCTCGCTCCTGGAA 3'
	<i>COL1</i>	5' GTGATGCTGGTCTGTTGGT 3'	5' CACCATCGTGAGCCTTCTCT 3'
	<i>COL2</i>	5' GTGTCAGGGCCAGGATGT 3'	5' TCCCAGTGTACAGACACAGAT 3'
	<i>AGG</i>	5' AGACTCACACAGTCGAAACAGCCA 3'	5' TCCTGGTCTGCAGCAGTTGATTCT 3'
	<i>HAPLN1</i>	5' AGTGTCTCTGAAGGGAGGCAGTGA 3'	5' ACCACACCTTGTAAAGTCCAGTGCT 3'
	<i>LPL</i>	5' ATGGCTGGACGGTAACAGGAATGT 3'	5' ATCCTGTCCACAGTTTGGTGTA 3'
	<i>PPARG</i>	5' GGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGT 3'	5' AGGGCTTGTAGCAGTTGTCTTGA 3'
	<i>ADPN</i>	5' GGTGAGAAAGGAGATCCAGGT 3'	5' TGCTGAGCGGTATACATAGGC 3'
	<i>SP7</i>	5' GCTTGAGGAGGAAGTTCACTATGGCT 3'	5' GTACGGCTTCTTTGTCCGTGCTTT 3'
	<i>OP</i>	5' CGCAGACCTGACATCCAGT 3'	5' GGCTGTCCCAATCAGAAGG 3'
	<i>ALP</i>	5' GACGGACCCGTCCTCTC 3'	5' GTGCCCCGTGGTCAATTCT 3'

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real (*qRT-PCR*) para detectar la expresión de genes en A) CMes humanas y ovinas y B) en CSMes.\* Genes constitutivos.

Para testar la expresión de genes propios de adipocitos, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células humanas/pocillo y  $5 \times 10^4$  células ovinas/pocillo, en placas de seis pocillos (Costar Corning Inc.). Las células se cultivaron en monocapa durante 21 días con el medio adipogénico específico. El

aislamiento y retrotranscripción de ARN, y el análisis de la expresión génica se realizaron como se especifica en el apartado **3.5.6**. Para evaluar la adipogénesis, se utilizaron cebadores especie-específicos (Tabla 2 A) para la lipoproteína lipasa (LPL) y la proteína de unión a ácidos grasos 4 (*FABP4*, *fatty binding protein 4*). En el caso de las células humanas, también se testó la adiponectina (ADPN). Además, en las células ovinas, tanto en células control como en células diferenciadas, se testaron genes de indiferenciación como la vimentina (VIM) y el SOX2.

- **Estimulación osteogénica.** Para testar histológicamente la diferenciación osteogénica, se sembraron  $33 \times 10^3$  células humanas/pocillo en una cámara de ocho pocillos y  $5 \times 10^3$  células ovinas/pocillo en una cámara de tres pocillos. Las células se cultivaron en monocapa con el medio osteogénico comercial *hMSC Bullekit Osteogenic Differentiation<sup>TM</sup> Medium* (Lonza), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, realizando cambios de medio cada dos o tres días. Tras 21 días de diferenciación se eliminó el medio, tanto de los pocillos estimulados como de los pocillos control, se lavaron con suero salino y se fijaron con formaldehído al 4%. Se realizó una tinción con Rojo Alizarina (*Merck*, Alemania) y se observó en un microscopio *Olympus BX61*, equipado con una cámara digital *Olympus DP70*. Esta tinción permite valorar la presencia de depósitos de calcio (Ca) que presentan coloración rojo-anaranjada.

Para testar la expresión de genes propios de osteoblastos, se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo, tanto de un tipo celular como del otro, en una placa de seis pocillos. Las células se cultivaron en monocapa durante 21 días con el medio osteogénico comercial. El aislamiento y retrotranscripción de ARN, y el análisis de la expresión génica se realizaron como se especifica en el apartado **3.5.6**. Para evaluar la osteogénesis, se utilizaron cebadores (Tabla 2 A) para la OP. En el caso de las células humanas, también se testó la fosfatasa alcalina (*ALP*, *alkaline phosphatase*). Además, en las células ovinas, tanto en células control como en células diferenciadas, se testaron los genes de indiferenciación VIM y SOX2.

- **Estimulación condrogénica.** Tanto para testar la diferenciación condrogénica mediante histoquímica e inmunohistoquímica, como para testarla mediante expresión génica, se realizó la formación de micromasas

(Johnstone y col., 1998). Para ello, se introdujeron  $2,5 \times 10^5$  células en tubos con fondo cónico de poliestireno (J.C. Catalán SL., España), se centrifugaron 10 min a 300xg, para facilitar la formación de un microprecipitado o micromasa que facilita la comunicación celular y, por tanto, la formación de MEC. Se realizaron varias réplicas con estimulación condrogénica, cultivadas en *hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium* (Lonza), con 10 ng/ml de *TGFβ3* (*ProSpec-Tany Technogene Ltd.*, Israel). Las réplicas sin estimular, utilizadas como control negativo, se cultivaron en medio de cultivo *DMEM20%*. Cada tres días se reemplazó el medio y se mantuvieron en cultivo durante 21 días.

Una vez transcurrido este tiempo, para el análisis histoquímico e inmunohistoquímico, dos micromasas estimuladas y dos micromasas control se fijaron, deshidrataron e incluyeron en parafina para su posterior corte al microtomo. A los cortes, de 4 μm de grosor, se les realizaron las tinciones de hematoxilina-eosina (H-E), Tricrómico de Masson (TM) y Safranina O (SO), e inmunohistoquímicas para Col I y Col II. El análisis se realizó tal y como se describe en el apartado **3.5.1.** y **3.5.2.**

Dos micromasas estimuladas y dos micromasas control se procesaron para la extracción de ARN, como se describe en el apartado **3.5.6.** Para evaluar la condrogénesis, sólo en células humanas se testó el SOX9. Tanto para células humanas como ovinas se utilizaron cebadores (Tabla 2 A) para otros genes típicos condrocíticos como AGG y COL2, y para genes no condrocíticos como el COL1. Además, en las células ovinas se testaron los genes de indiferenciación VIM y SOX2, tanto en células control como en células diferenciadas.

### **3.2.2. Caracterización de las células derivadas de células pluripotentes inducidas**

La caracterización de las CSMEs, mediante el análisis de expresión de marcadores de superficie y diferenciación multipotente, se realizó en el IBEC. Como control se utilizaron CMEs-TA obtenidas previamente en el laboratorio del IBEC.

### 3.2.2.1. Análisis de la expresión de marcadores de superficie en las células derivadas de células pluripotentes inducidas

Se realizó la citometría de flujo tanto a las CMEs-TA como a las C-CSMEs y NC-CSMEs, en pases 5-8. Para ello, se utilizó un panel de marcadores de superficie típico de CMEs humanas. Las células se disociaron con Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) y se lavaron dos veces en tampón fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline, Gibco) al 1% de albúmina de suero bovino (ASB, Sigma-Aldrich). Un total de  $1 \times 10^5$  células se incubaron con Ac específicos conjugados con fluorocromos (Tabla 3). Al menos  $1 \times 10^4$  eventos celulares se adquirieron de cada condición, utilizando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, España) y el programa Gallios 1.1. Los resultados se expresaron como el porcentaje positivo medio  $\pm$  E.E. La expresión de los marcadores de superficie celular se consideró positiva sólo cuando la presencia en la población fue superior al 2,5%.

Ac	Fluorocromo	Dilución	Casa Comercial
Anti-humano CD29	PE	1:50	BD-Bioscience
Anti-humano CD34	PE	1:10	BioLegend
Anti-humano CD44	FITC	1:50	BioLegend
Anti-humano CD73	PE	1:50	BioLegend
Anti-humano CD90	PE	1:50	BioLegend
Anti-humano CD105	APC	1:20	BioLegend
Anti-humano CD271	FITC	1:20	BioLegend

**Tabla 3.** Ac utilizados en la citometría de flujo, para la caracterización de los marcadores de superficie expresados por las CSMEs y las CMEs-TA. APC, Alofococianina (*Allophycocyanin*); PE, ficoeritrina (*phycoerythrin*); FITC, isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*).

### 3.2.2.2. Capacidad de diferenciación multipotente in vitro de las células derivadas de células pluripotentes inducidas

- **Estimulación adipogénica.** Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  en placas de seis pocillos y se les añadió medio de diferenciación adipogénico compuesto por medio mínimo esencial de Eagle con

modificación  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM, *Minimum Essential Medium Eagle Alpha modification*; Gibco) con 10% SBF, 1  $\mu$ M dexametasona (Dex, *Sigma-Aldrich*), 100  $\mu$ M indometacina (*Sigma-Aldrich*), 0,5 mM 1-metil-3-isobutilxantina (*Sigma-Aldrich*), 10  $\mu$ g/ml insulina (*Sigma-Aldrich*) y 1% P/E. El cultivo se mantuvo 21 días y se realizaron cambios de medio cada tres días.

El potencial de diferenciación se evaluó histológicamente mediante la tinción con *Oil Red O*, utilizando el microscopio *Leica DMIL LED* (*Leica*, Alemania).

Para la evaluación de la diferenciación adipogénica, el aislamiento y retrotranscripción de ARN así como el análisis de la expresión génica, se realizaron como se especifica en el apartado 3.5.6. Se analizó la expresión de los genes típicos adipocíticos ADPN, LPL y el *receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma)* (Tabla 2 B). Los análisis de expresión se normalizaron frente al gen *GAPDH*.

- **Estimulación osteogénica.** Las células se cultivaron durante 21 días, a una densidad de  $1 \times 10^5$  en placas de seis pocillos y con medio de diferenciación osteogénico compuesto por  $\alpha$ -MEM con 10% SBF, 100 nM Dex, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato (*Sigma-Aldrich*), 50  $\mu$ M L-ácido ascórbico (AA, *Sigma-Aldrich*) y 1% P/E. El medio se cambió cada tres días.

La deposición mineral se detectó con la tinción Rojo Alizarina, utilizando el microscopio *Leica DMIL LED*.

El aislamiento de ARN, retrotranscripción y análisis de *PCR* cuantitativa a tiempo real (*qRT-PCR, quantitative real time PCR*), para detectar la expresión de los genes típicos osteoblásticos *ALP*, *osterix (Sp7)* y *OP* (Tabla 2 B), se realizaron como se especifica en el apartado 3.5.6.

- **Estimulación condrogénica.** Se formaron micromasas de  $2,5 \times 10^5$  células mediante centrifugación en tubos. Se cultivaron con medio condrogénico consistente en *DMEM* alto en glucosa con L-glutamina y piruvato sódico (*Gibco*), con 1% de *KO-SR*, 2mM Glx, 40 mg/ml prolina (*Sigma-Aldrich*), 1% de *Insuline-transferrin-selenous acid premix (ITS)*, *Gibco*), 50 mg/ml AA, 100 nM Dex, 10 ng/ml *TGF $\beta$ 1 (Peprotech)* y 1% P/E. El medio se cambió cada tres días, durante los 21 días de diferenciación.



La diferenciación condrogénica se evaluó histológicamente mediante tinción de cortes de parafina con SO y TM.

Dos micromasas estimuladas y dos micromasas control se procesaron para la extracción de ARN, como se describe en el apartado **3.5.6**. Se analizó la expresión de la proteína 1 de unión a AH y PGs (*HAPLN1*, *hyaluronic acid and proteoglycan protein link 1*), COL2, COL1 y AGG (Tabla 2 B), utilizando *qRT-PCR*.

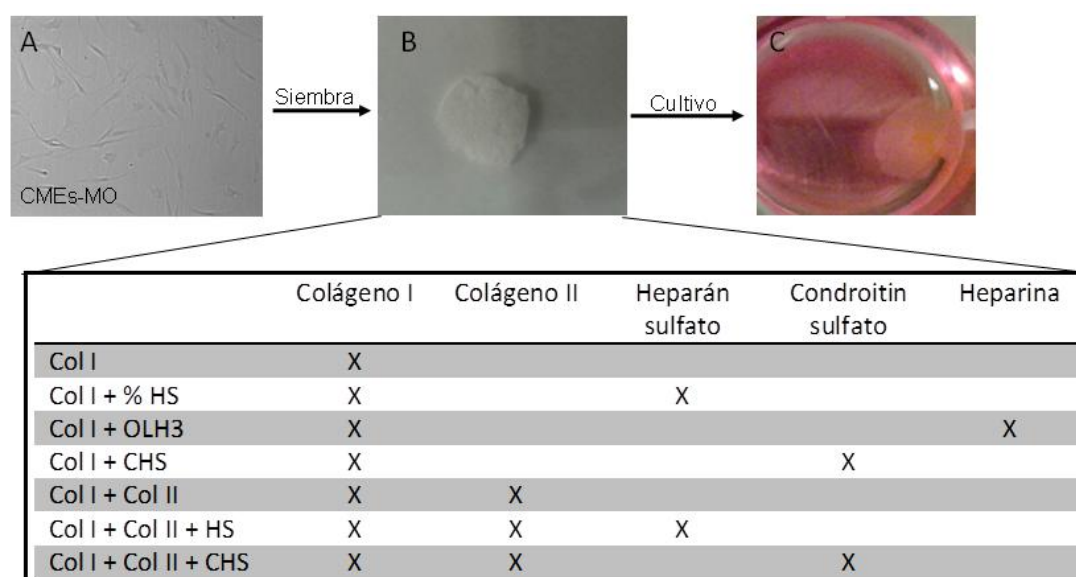
### **3.3. Siembra y cultivo de las células mesenquimales estromales sobre biomateriales**

#### **3.3.1. Características de los soportes**

Todos los biomateriales de Col, obtenido a partir de tendón equino, fueron suministrados por la empresa Opocrin S.p.A (Italia).

Para la diferenciación condrogénica se emplearon esponjas de 1 cm<sup>2</sup> de superficie, compuestas por Col I y Col I con diferentes concentraciones de HS: 1%, 2% y 3% (Figura 12). La caracterización de los lotes de HS utilizado mostró un 100% de pureza, una relación molar baja de iones de sulfato e iones carboxilato (0,77) y un alto peso molecular (25KD). Además, se observó muy baja actividad anticoagulante (<1 APTTU/mg), lo que asegura la falta de efectos adversos hemorrágicos. La porosidad de las esponjas aumentó desde 148,30 ± 57,90 µm (en Col I) a 406,90 ± 155,20 µm (en Col I +3%HS). El comportamiento de los biomateriales como una función de la temperatura fue evaluada mediante calorimetría de barrido diferencial (*DSC*, *differential scanning calorimetry*). El punto de intersección entre la línea de base y la sección lineal de la curva endotérmica ascendente ( $T_{onset}$ ) puede ser considerado un parámetro representativo de la temperatura de desnaturalización del polímero. Los soportes de Col I muestran una temperatura de desnaturalización cercana a 45,30 ± 0,30°C. Los análisis *DSC* demostraron que la presencia de HS y su concentración afecta al comportamiento térmico de las esponjas. La temperatura de desnaturalización de Col I +3%HS aumentó por encima de los 50°C, lo que indica una mayor

estabilidad térmica de este soporte; mientras que un porcentaje de HS menor del 2% no ha afectado notablemente a la transición térmica del Col. [Los datos de caracterización han sido suministrados por OPOCRIN SpA y por la Dra. Barbara Ruozzi (grupo TEFARTI, departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de Modena y Reggio Emilia, Italia)].



**Figura 12.** Cultivo de las CMEs-MO sobre los diferentes biomateriales. A) Cultivo de CMEs-MO visualizado en un microscopio óptico invertido. B) Imagen de una esponja de Col previa al cultivo y tabla de la composición de los diferentes soportes utilizados para la diferenciación condrogénica. C) Imagen de un constructo en cultivo.

También, para testar la diferenciación condrogénica, se utilizaron otros cinco tipos diferentes de biomateriales (Figura 12): Col I + heparina (Col I +OLH3), Col I +CHS, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS.

En cuanto a la diferenciación osteogénica, se utilizaron esponjas de Col I, de 6 mm de diámetro; y, 100 mg de cerámica sintética de  $\beta$ -FTC (*Macrobone*, Euroteknika Iberia, España), de 1000-2000  $\mu$ m de tamaño de grano (provistas por el Instituto Coruñés de Implantología y Rehabilitación Oral, ICIRO).

### 3.3.2. Diferenciación condrogénica de células mesenquimales estromales humanas sobre biomateriales de colágeno I y heparán sulfato

Se emplearon cuatro tipos de soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Un agrupamiento de células procedentes de cinco donantes, fue sembrado sobre los soportes ( $2 \times 10^5$  CMEs-MO/cm<sup>2</sup> de soporte) y cultivado en condiciones de normoxia (Figura 12 A-C), en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

La diferenciación condrogénica se indujo cultivando, durante 15 y 30 días, las CMEs-MO (Figura 12 A) sobre los soportes (de ahora en adelante, constructos) en el medio condrogénico comercial con 10 ng/ml de *TGFβ3* y 100 nM de *PTHrP* (proporcionado por Pedro Esbrit de la Fundación Jiménez Díaz - Madrid). A modo de control sin estimular, los constructos fueron cultivados en *DMEM20%* con *PTHrP*. También se cultivaron durante 15 y 30 días soportes sin células, en medio condrogénico con *TGFβ3* y *PTHrP*. Todos los soportes se sembraron por triplicado para los diferentes medios y tiempos de cultivo, realizando cambios de medio tres veces a la semana. Los sobrenadantes del cultivo fueron almacenados para analizar la cantidad de Col liberado por las células al medio.

Los distintos constructos se sometieron a diferentes estudios para analizar la capacidad de diferenciación condrogénica: técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, estudios de microscopía electrónica y biología molecular.

### 3.3.3. Diferenciación condrogénica de células mesenquimales estromales humanas sobre biomateriales de colágeno y glicosaminoglicanos

Las CMEs-MO de ocho donantes se juntaron para formar dos agrupamientos celulares. Las células se cultivaron en cinco tipos diferentes de biomateriales: Col I +OLH3, Col I +CHS, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 30 días en medio condrogénico comercial con 10 ng/ml de *TGFβ3*, en condiciones de normoxia en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 12). A modo de control

negativo, también se cultivaron soportes sin células en el mismo medio y durante el mismo periodo de tiempo. El medio de cultivo se cambió dos o tres veces por semana, reservando los sobrenadantes para el estudio de la liberación de Col.

Después de 30 días, se recogieron seis réplicas independientes de cada tipo de soporte para los estudios histológicos, inmunohistoquímicos, de microscopía electrónica y análisis de *qRT-PCR*.

#### **3.3.4. Diferenciación osteogénica de células mesenquimales estromales ovinas sobre soportes de colágeno I y $\beta$ fosfato tricálcico**

Se utilizaron dos tipos diferentes de soportes para la diferenciación osteogénica: Col I y  $\beta$ -FTC. Se sembraron  $2 \times 10^5$  oCMEs-MO, en pase tres, en diferentes réplicas de esponjas de Col I y de  $\beta$ -FTC. Los constructos se cultivaron con medio comercial osteogénico, en condiciones de normoxia, realizando cambios de medio cada dos o tres días. Además, se cultivaron soportes sin células en el mismo medio y periodo de tiempo como control negativo. Tras 30 días de cultivo, las muestras fueron recolectadas para realizar análisis histológicos, inmunohistoquímicos y estudios de microscopía electrónica.

### **3.4. Desarrollo de modelos *in vitro* de lesión de cartílago articular humano y ovino**

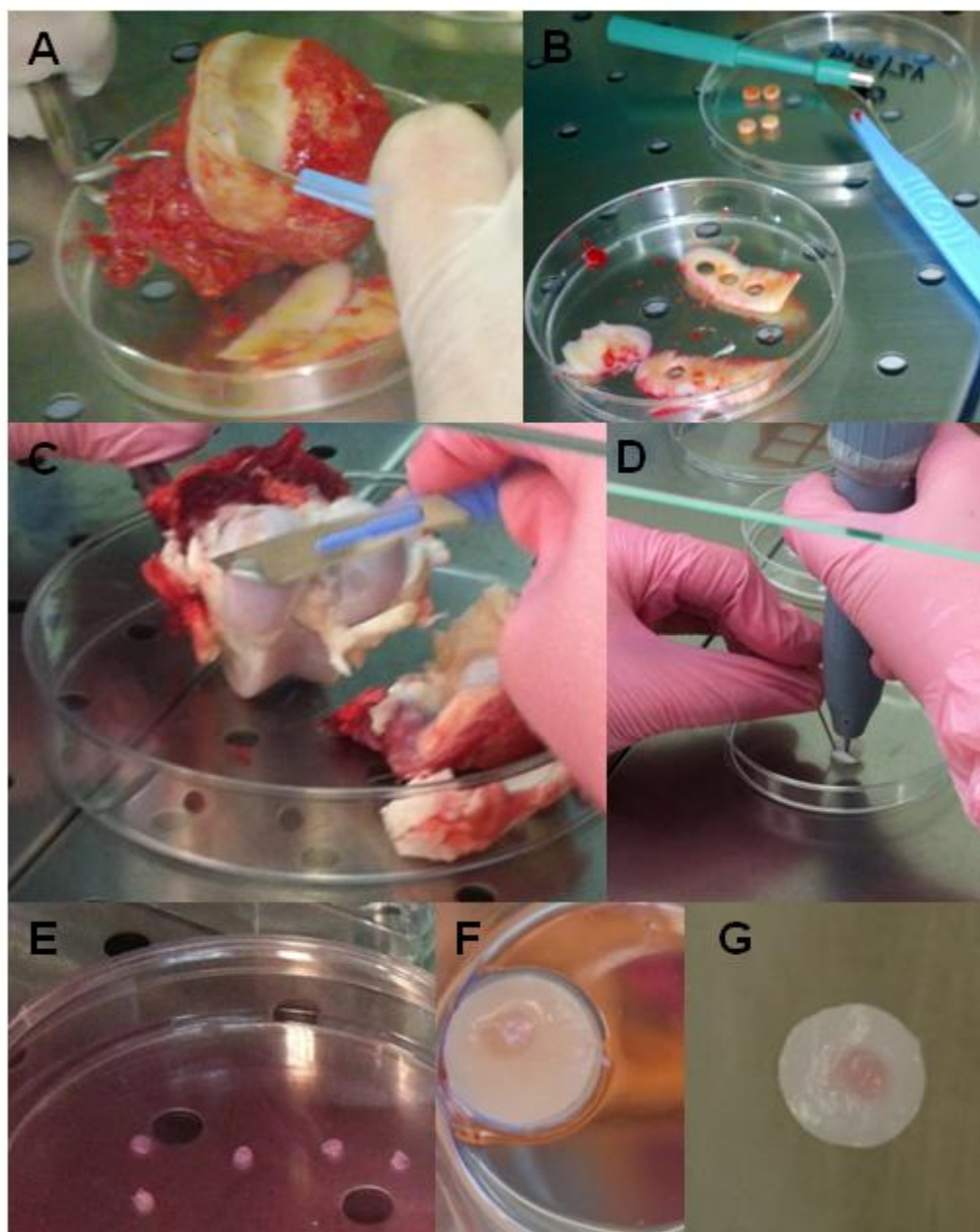
#### **3.4.1. Obtención del cartílago articular humano y ovino**

Las muestras de cartílago humano se obtuvieron de cuatro donantes que se sometieron a cirugía de reemplazamiento de rodilla o cadera, debido a fractura o OA. El cartílago se escindió (Figura 13 A) utilizando un bisturí (*Swann Morton*, Reino Unido) y se obtuvieron cilindros de cartílago de 6 mm de diámetro, con un punzón de biopsias (*Kai Medical*, Alemania) (Figura 13 B).

Los cóndilos femorales ovinos se obtuvieron de cuatro especímenes de oveja doméstica. Estos animales fueron previamente sacrificados de acuerdo a las

directrices del Centro Tecnológico de Formación, de la Unidad de Cirugía Experimental (UCEX) del CHUAC.

El cartílago ovino se obtuvo de los cóndilos femorales, por escisión con un bisturí (Figura 13 C). Se obtuvieron biopsias de 6 mm de diámetro con un punzón de biopsias.



**Figura 13.** Modelo de lesión de cartílago articular ovino y humano *in vitro*. A) Obtención de cartílago a partir de la cabeza femoral humana. B) Obtención de cilindros condrales mediante un punzón de biopsias. C) Obtención de cartílago a partir de cóndilo femoral ovino. D) Generación de la lesión con una fresa odontológica. E) Siembra de las CMEs-MO sobre las esponjas. F) Imagen de un constructo introducido en una lesión de cartílago humano. G) Imagen de un constructo introducido en una lesión de cartílago ovino.

### 3.4.2. Generación de la lesión focal en el cartílago

A las biopsias de cartílago, humano y ovino, se les realizaron lesiones de 3 mm de diámetro utilizando una fresa odontológica (*Gbr. Brasseler GmbH & Co. KQ*, Alemania) acoplada a un microrrotor (*EWL K9*, Alemania) (Figura 13 D).

### 3.4.3. Siembra de las células mesenquimales estromales humanas y ovinas sobre los biomateriales de colágeno

Los soportes de Col, en los que las CMEs-MO obtuvieron mejor fenotipo, fueron utilizados en el modelo de lesión: Col I, Col I +3%HS, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS. Se sembraron  $2 \times 10^5$  CMEs-MO en la superficie de los soportes de 4 mm de diámetro y se incubaron 1 h a 37°C (Figura 13 E). Transcurrido este tiempo, los constructos se introdujeron en la lesión (Figura 13 F).

En el caso del modelo ovino, sólo se testaron soportes de Col I en los que se sembraron  $2 \times 10^5$  oCMEs-MO en la superficie de los soportes de 4 mm de diámetro y se incubaron 1 h a 37°C. A continuación, el constructo se introdujo dentro de la lesión (Figura 13 G).

### 3.4.4. Cultivo de las células mesenquimales estromales humanas sobre los biomateriales en la lesión de cartílago articular humano

El modelo de lesión humano constó de tres grupos de tratamiento diferentes que se mantuvieron en cultivo durante ocho semanas en normoxia, en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>, con cambios de medio cada 3-4 días:

- Grupo sin pre-tratamiento de IL1 $\beta$  (No-IL): los constructos se introdujeron dentro de la lesión y se cultivaron en medio condrogénico comercial con 10 ng/ml de TGF $\beta$ 3. Se cultivaron controles de biopsias sólo con lesión y con soportes sin células dentro de la lesión.
- Grupo IL: las biopsias de cartílago, a las que se les realizaron las lesiones, se pre-trataron con 10 ng/ml de IL1 $\beta$ . Tras 24 h, los constructos se introdujeron dentro de la lesión y se añadió el medio condrogénico con 10 ng/ml de TGF $\beta$ 3. Tras ocho semanas de cultivo, las muestras se fijaron y embebieron en parafina para realizar los análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

### **3.4.5. Cultivo de las células mesenquimales estromales ovinas sobre los biomateriales en la lesión de cartílago articular ovino**

Las biopsias, con el constructo introducido en la lesión, se cultivaron en medio condrogénico comercial con 10 ng/ml de *TGFβ3*, cambiando el medio cada 3-4 días. Tras 8 semanas las muestras se fijaron y embebieron en parafina para realizar los análisis histológicos e inmunohistoquímicos. Se cultivaron controles de biopsias sólo con lesión.

### **3.5. Análisis de la capacidad de diferenciación de las células cultivadas sobre los soportes y de la reparación en los modelos de lesión *in vitro***

Las técnicas de tinción histológicas e inmunohistoquímicas se desarrollaron con la colaboración de la Plataforma de Histomorfología del Instituto de Investigación Biomédica da Coruña (INIBIC). Los estudios moleculares y de liberación de Col al medio de cultivo fueron realizados en nuestro grupo de investigación. Los estudios ultraestructurales y morfométricos se realizaron en el *Servizo de Apoio á Investigación (SAI)* de la *Universidade da Coruña (UDC)*.

#### **3.5.1. Análisis histológico de los constructos, osteogénicos y condrogénicos, y de los modelos de lesión *in vitro***

Para la evaluación histológica de los constructos, los soportes sin células y los modelos se fijaron en formaldehído al 4%. A continuación, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcoholes, aunque en los constructos osteogénicos se realizó una descalcificación previa. Las muestras deshidratadas se incluyeron en bloques de parafina, a los que se les realizaron cortes de 4 µm de grosor. Los cortes se desparafinaron en xilol, se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol y se tiñeron con H-E, para observar el núcleo y citoplasma celular, así como la MEC. A las muestras osteogénicas se les realizó, además, tinción con *von Kossa (VK)* y Rojo Alizarina para la detección de mineralización y de depósitos cálcicos. A las muestras

condrogénicas se les realizaron tinciones con TM y SO, para la detección de Col y PGs, respectivamente.

Tanto las tinciones histológicas como inmunohistoquímicas se evaluaron utilizando el programa *analySIS® D* (Olympus, Alemania), en un microscopio óptico *Olympus BX61* equipado con una cámara digital *Olympus DP70*. A la hora de realizar los análisis se tuvo en cuenta la intensidad de tinción celular y de la MEC, pero no la procedente del soporte.

La intensidad de tinción y el porcentaje de células teñidas se midió en tres áreas diferentes de cada muestra para obtener un valor medio. El porcentaje de células en el área estudiada del soporte fue agrupada de la siguiente forma: 1-24% (valor 1), 25-49% (valor 2), 50-74% (valor 3) y 75-100% (valor 4). Los resultados histológicos se expresaron semi-cuantitativamente de acuerdo a la intensidad de tinción o ausencia: negativo o ausente (- ó 0), débil (+ ó 1), moderado (++ ó 2) y fuerte (+++ ó 3). El valor 3 ó +++ de intensidad de tinción se asignó a aquellas muestras con mayor intensidad de tinción o con mayor metacromasia.

En los constructos condrogénicos, para llevar a cabo una evaluación global, los porcentajes de tinción se calcularon como el producto categorizado de los valores de intensidad/ausencia de tinción y el porcentaje de células. Las puntuaciones obtenidas comprendieron entre un valor mínimo de 1 y un máximo de 12: 1-4 valor bajo, 5-8 valor intermedio y 9-12 valor alto (Tablas 4 y 5, Anexo III).

### **3.5.2. Análisis inmunohistoquímico de los constructos, osteogénicos y condrogénicos, y de los modelos de lesión *in vitro***

Los análisis inmunohistoquímicos se realizaron mediante la incubación, en las secciones del constructo desparafinadas, de Ac primarios monoclonales para detectar la presencia de Col I en constructos condrogénicos y osteogénicos; Col II, Col X, *Agg*, *MMP13* (todos los Ac de *ThermoFisher Scientific*) y el antígeno nuclear de proliferación celular (*PCNA*, *proliferating cell nuclear antigen*; Calbiochem, España) sólo en constructos condrogénicos; y osteocalcina (OCN, *ThermoFisher Scientific*) sólo en constructos osteogénicos.



Para determinar la interacción antígeno-Ac, los Ac marcados con peroxidasa se revelaron con 3,3'- diaminobencidina (DAB) y agua oxigenada, utilizando el kit de peroxidasa/DAB *ChemMate™ DAKO EnVision™* (Dako).

La inmunotinción para *PCNA* también se expresó como el porcentaje de células inmunoteñidas: 1-24% (valor 1), 25-49% (valor 2), 50-74% (valor 3) y 75-100% (valor 4).

Los resultados inmunohistoquímicos, también se expresaron semi-cuantitativamente de acuerdo a la intensidad o ausencia de tinción y se realizó una evaluación global, teniendo en cuenta el porcentaje de células. Las puntuaciones obtenidas comprendieron entre un valor mínimo de 1 y un máximo de 12: 1-4 valor bajo, 5-8 valor intermedio y 9-12 valor alto (Tabla 4 y 5, Anexo III).

### 3.5.3. Evaluación de la reparación en los modelos de lesión *in vitro*

Para la medida de la calidad del tejido de reparación, tanto en el modelo humano como en el modelo ovino, se utilizó la escala semicuantitativa *ICRSII* modificada. La modificación que se realizó en esta escala ha sido la omisión de parámetros que no se pueden observar en un modelo *in vitro* de cartílago. Así, la escala *ICRSII* modificada constó de siete de los catorce parámetros inicialmente descritos (Mainil-Varlet y col., 2010).

### 3.5.4. Análisis ultraestructural y morfométrico de los constructos osteogénicos y condrogénicos

- **Microscopía electrónica de transmisión (MET).** Los constructos se analizaron mediante MET para estudiar la ultraestructura de las células. A modo de control negativo, se utilizaron soportes sin células que fueron cultivados durante los mismos periodos de tiempo en medio condrogénico. Los constructos y los soportes se fijaron con el tampón cacodilato al 3% de glutaraldehído y se post-fijaron con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ). Las muestras se deshidrataron en una secuencia gradual de concentraciones crecientes de acetona y se embebieron en *Spurr* (*Electron Microscopy Sciences*, EE. UU.). La ultraestructura se estudió en cortes de 60 nm, realizados en un ultramicrotomo *Leica AG Reichert Ultracut E 701704*

(*Leica*), mediante el microscopio de transmisión *JEOL JEM 1010* (*Jeol*, Japón).

- **Microscopía electrónica de barrido (MEB).** Para evaluar la morfometría en los constructos, los soportes con y sin células cultivados durante el mismo periodo de tiempo se analizaron mediante MEB. Las muestras se fijaron con el tampón cacodilato al 3% de glutaraldehído y se post-fijaron con  $\text{OsO}_4$ . Posteriormente, se deshidrataron en una secuencia gradual de etanol y utilizando el punto crítico de  $\text{CO}_2$  (*Balzers*, Alemania). Finalmente, las muestras se metalizaron con oro en un equipo de pulverización catódica *Bal-Tec SCD 004* (*Balzers*) y se visualizaron utilizando el microscopio electrónico de barrido *JEOL JSM 6400* (*Jeol*).

### 3.5.5. Estudio de los constructos osteogénicos de colágeno I mediante energía dispersiva de rayos x

Para el análisis de energía dispersiva de rayos X (EDX), secciones de Spur de 5  $\mu\text{m}$  se depositaron en un portaobjetos para MEB. Los cortes se recubrieron con una fina capa de carbón puro de grafito, utilizando el equipamiento *Bal-Tec CEA 035* (*Balzers*). Posteriormente, las muestras se analizaron en el microscopio electrónico de barrido *JEOL JSM 6400* equipado con un sistema de microanálisis químico a través de la EDX (*Oxford INCA Energy 200*, Reino Unido).

### 3.5.6. Estudios moleculares de los constructos condrogénicos y de las diferenciaciones celulares

- **Homogeneización de los constructos condrogénicos.** Se trocearon e introdujeron los constructos de cada tipo de soporte, en tubos con esferas de circonio (*Retsch*, Alemania), y se congelaron en nitrógeno líquido. Los tubos se introdujeron en el tambor de un *Mixer Mill MM200* (*Retsch*) para desintegrar las muestras. Se realizaron 2 ciclos de 90 s con una frecuencia de agitación de 25/s, congelando de nuevo en nitrógeno líquido entre ciclos.

Las células diferenciadas se lisaron mecánicamente. Una vez disgregados los constructos y las células se procedió al aislamiento del ARN.

- **Aislamiento del ARN total, síntesis del ADNc y *qRT-PCR*.**

En el caso de los homogeneizados de los constructos condrogénicos y de las diferenciaciones de las CMEs, humanas y ovinas, la extracción de ARN se realizó con el reactivo *Trizol®* (*Invitrogen*, España) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La concentración de ARN se midió utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-1000* (*ThermoFisher Scientific*). Al ARN se le realizó un tratamiento con DNasa I (*Fermentas*, España). Para sintetizar el ADNc, al ARN total se le realizó la reacción de *PCR* de retrotranscripción (*RT-PCR*, *Reverse transcription polymerase chain reaction*) utilizando el *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* (*Invitrogen*), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 2 A, la *qRT-PCR* se realizó en un *LightCycler® 480 Instrument* (*Roche*, Alemania) con el *LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix* (*Roche*), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La reacción de *PCR* consistió en 10 µl de Master Mix 2x, 0,25 µM de los cebadores *forward* y *reverse*, el ADNc y el agua hasta un volumen final de 20 µl, en una placa de 96 pocillos *LightCycler 480 Multiwell Plate 96* (*Roche*). Para los cebadores de genes humanos, se inició la activación enzimática a 95°C 10 min, a continuación se amplificó en 3 pasos secuenciales: 95°C durante 10 s, 61°C durante 5 s y 72°C durante 7 s. Después de la amplificación, se realizaron los análisis de las curvas de temperatura de fusión en tres pasos: 95°C durante 5 s, 65°C en 60 s y 97°C por 1 s. Finalmente, se realizó un paso de enfriamiento a 40°C durante 20 s. Para los cebadores de genes ovinos, el programa utilizado fue el mismo, a excepción de la amplificación: 95°C durante 10 s, 60°C durante 5 s y 72°C durante 9s. Para analizar la expresión en los constructos condrogénicos se utilizó la *TBP*, como gen constitutivo, y cebadores para genes típicos condrocíticos (*SOX9*, *AGG*, *COL2*) y/o típicos fibroblásticos (*COL1*) o de hipertrofia (*COL10*) (Tabla 2 A). Los genes testados en las diferenciaciones celulares han sido previamente especificados en el apartado 3.2.1.2. El análisis de los datos se realizó en el programa *LightCycler® 480 Relative Quantification* (*Roche*). Los niveles relativos de expresión (NRE) se calcularon mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

En el caso de las diferenciaciones de las CSMEs, el aislamiento del ARN, su retrotranscripción y análisis mediante *qRT-PCR*, se realizaron en el IBEC. En primer lugar, se extrajo el ARN con *TriReagent®* (Sigma-Aldrich) y se midió la concentración utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-1000*. Posteriormente, se realizó la retrotranscripción con la *SuperScript® IV reverse transcriptase* (Invitrogen) y una *qRT-PCR*, utilizando *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Invitrogen) y el termociclador a tiempo real *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EE.UU.). Los genes testados en las diferenciaciones celulares han sido previamente especificados en el apartado 3.2.2.2. El análisis de los datos se realizó en el programa *Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) y los NRE se calcularon, con respecto al gen constitutivo, en el programa *qBase* (Primerdesign Ltd, Reino Unido).

### 3.5.7. Análisis de liberación de colágeno al medio de cultivo por parte de los constructos condrogénicos

El Col total, liberado por los constructos al medio de cultivo condrogénico, fue medido cada 3-4 días utilizando el *Sircol™ Soluble Collagen Assay* (Biocolor, Reino Unido) según las instrucciones de la casa comercial. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro *Infinite® 200 PRO NanoQuant* (Tecan, Suiza). Para evitar incluir el Col proveniente de la degradación del soporte, se midió la absorbancia en sobrenadantes de cultivos de biomateriales sin células. Esta medida se sustrajo de los datos de los sobrenadantes de los constructos. Los datos de los constructos cultivados en *DMEM20%*, se compararon con los obtenidos en los sobrenadantes de los constructos condrogénicos.

## 3.6 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron, cuando  $n \geq 3$ , utilizando el programa *SPSS 17.0 -18.0* para Windows y el *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., EE.UU.), mediante análisis no paramétrico. Los *p*-valores inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

---



## 4.1. Caracterización celular

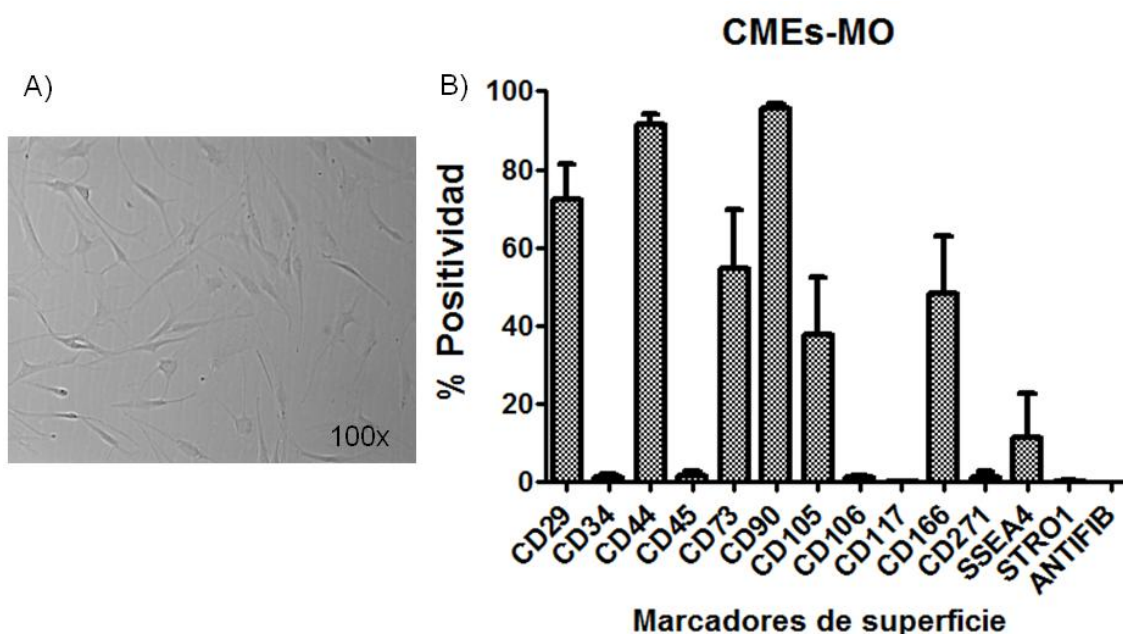
### 4.1.1. Caracterización de las células aisladas de médula ósea humana

Las CMEs-MO se aislaron mediante lavados de la MO humana. Las células que se aislaron de la MO presentaron morfología fibroblástica, con citoplasma irregular y numerosas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 14 A). Además, presentaron capacidad de adherencia al plástico de los frascos de cultivo.

#### 4.1.1.1. Expresión de marcadores de superficie en las células aisladas de médula ósea humana

Las células aisladas de MO humana se caracterizaron mediante citometría de flujo, estudiando la expresión de marcadores de superficie típicos de CMEs y células hematopoyéticas. El perfil de expresión se muestra en la Figura 14 B.

Las células expresaron marcadores de superficie típicos de CMEs, mostrando un alto porcentaje de positividad para CD29 ( $72,37 \pm 8,79\%$ ), CD44 ( $91,58 \pm 2,61\%$ ) y CD90 ( $95,57 \pm 1,18\%$ ) y un porcentaje moderado para CD73 ( $54,71 \pm 14,85\%$ ), CD166 ( $48,30 \pm 14,71\%$ ) y CD105 ( $37,62 \pm 14,94\%$ ).



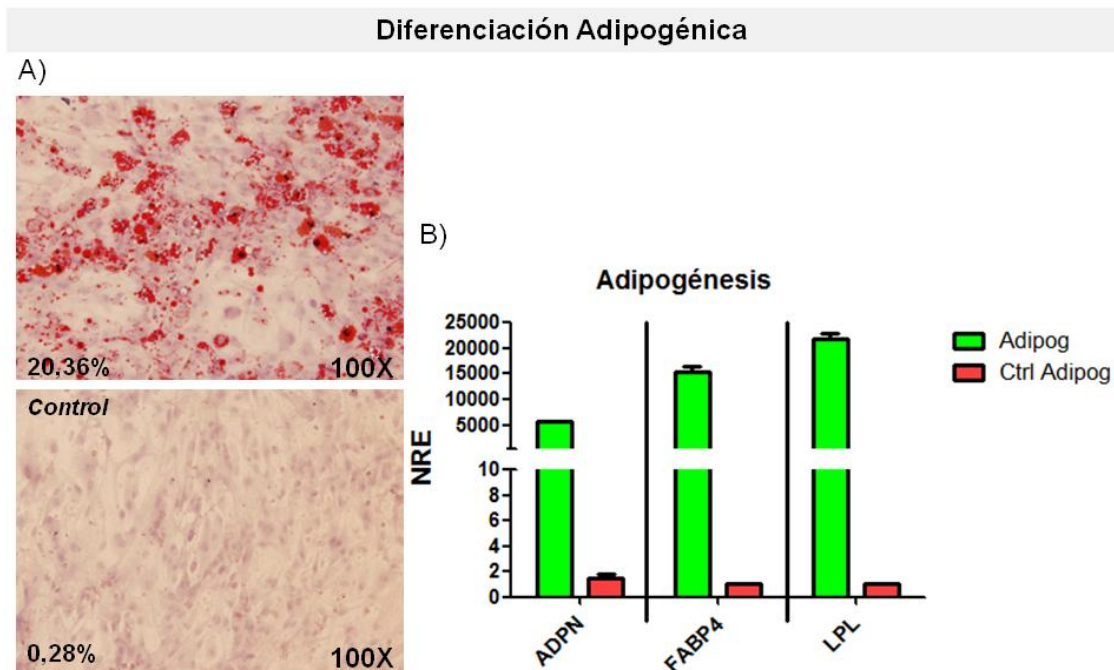
**Figura 14.** Caracterización fenotípica de las células aisladas de MO humana. A) Imagen obtenida al microscopio óptico de las células aisladas. B) Porcentajes de positividad obtenidos por las células aisladas para los diferentes marcadores de superficie.

Por otro lado, no se detectó positividad para los marcadores hematopoyéticos CD34 ( $1,23 \pm 0,84\%$ ) y CD45 ( $1,65 \pm 0,90\%$ ), indicando la ausencia de contaminación por células hematopoyéticas de la MO (Figura 14 B).

Las células mostraron positividad débil para el marcador de células embrionarias SSEA4 ( $11,39 \pm 11,40\%$ ). Finalmente, las células no mostraron positividad ni para CD106 ( $1,09 \pm 0,67$ ), CD117 ( $0,09 \pm 0,09\%$ ), CD271 ( $1,41 \pm 1,28\%$ ), STRO-1 ( $0,17 \pm 0,17\%$ ) ni para el marcador de fibroblastos ( $0,00 \pm 0,00\%$ ) (Figura 14 B).

#### 4.1.1.2. Diferenciación adipogénica de las células aisladas de médula ósea humana

Las células estimuladas con medio adipogénico mostraron mayor presencia de vacuolas positivas para la tinción con *Oil Red O* ( $20,36 \pm 3,93\%$ ) que en las células control ( $0,28 \pm 0,39\%$ ) (Figura 15 A).



**Figura 15.** Diferenciación adipogénica de las células aisladas de MO humana. A) Imágenes de la tinción con *Oil Red O* de las células estimuladas con medio adipogénico y de las células control, crecidas en DMEM20%. B) NRE de los genes característicos de adipocitos, ADPN, LPL y *FABP4*. Adipog: células estimuladas adipogénicamente; Ctrl adipog: células control sin estimular.

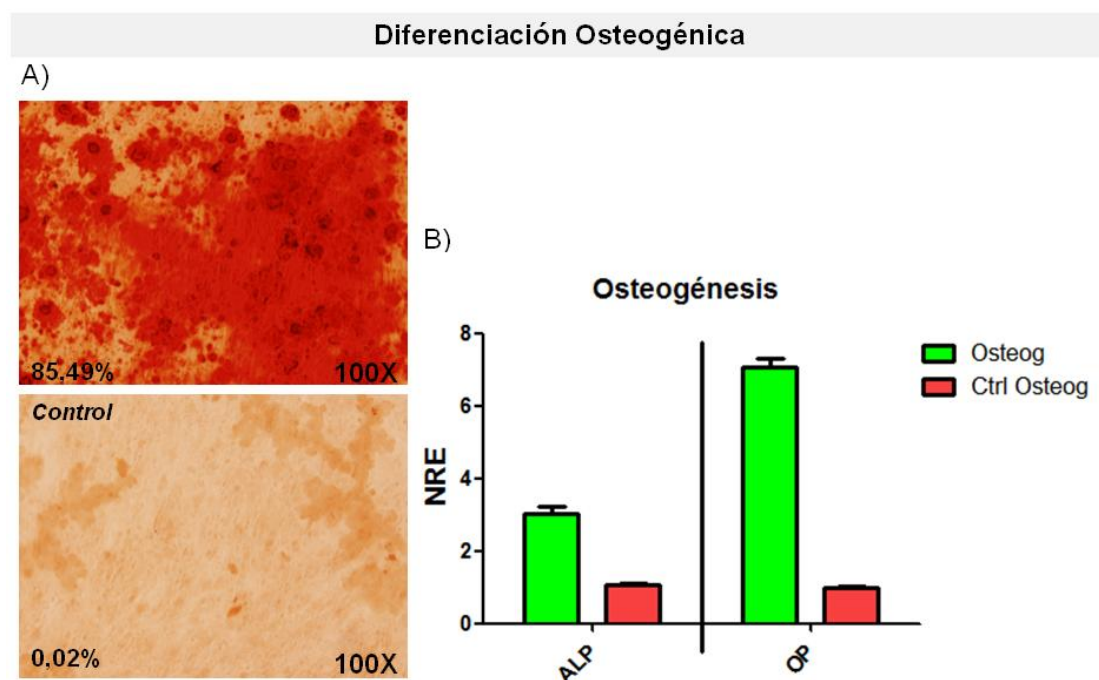
La diferenciación adipogénica también se evaluó mediante *qRT-PCR*, estudiando los NRE de ADPN, LPL y *FABP4*. En el análisis de expresión, las



células diferenciadas mostraron expresión de estos genes típicos adipocíticos (Figura 15B). Los NRE de *ADPN* y *FABP4* tendían a ser mayores en las muestras estimuladas ( $5821,06 \pm 96,37$ ;  $15319,12 \pm 1032,24$ , respectivamente) que en las muestras control sin estimular ( $1,51 \pm 0,31$ ;  $1,05 \pm 0,03$ , respectivamente). Sin embargo, *LPL* mostró una mayor expresión relativa en células diferenciadas adipogénicamente ( $21728,25 \pm 1141,42$ ) que en las cultivadas en *DMEM20%* ( $1,04 \pm 0,04$ ).

#### 4.1.1.3. Diferenciación osteogénica de las células aisladas de médula ósea humana

Los valores de positividad para la tinción con Rojo Alizarina variaron desde  $85,49 \pm 15,79\%$ , cuando las células se estimularon durante 21 días en medio osteogénico, hasta  $0,02 \pm 0,01\%$  en las células control (cultivadas en *DMEM20%*) (Figura 16 A).



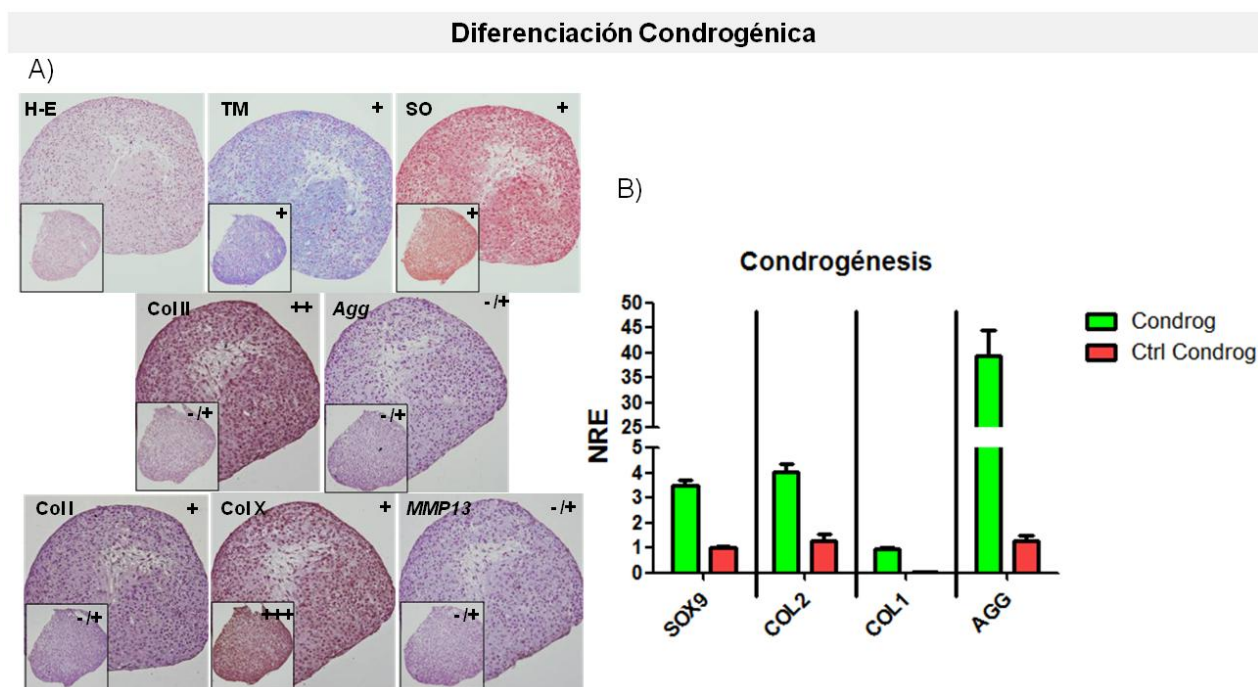
**Figura 16.** Diferenciación osteogénica de las células aisladas de MO humana. A) Imágenes de la tinción con Rojo Alizarina de las células estimuladas con medio osteogénico y de las células control, crecidas en *DMEM20%*. B) NRE de los genes característicos de osteoblastos, *ALP* y *OP*. Osteog: células estimuladas osteogénicamente; Ctrl osteog: células control sin estimular.

La diferenciación osteogénica también se evaluó mediante análisis molecular (Figura 16 B), estudiando los NRE de los genes *OP* y *ALP*. La tendencia de la

expresión relativa de *ALP* fue mayor en células estimuladas ( $3,04 \pm 0,19$ ) que en sus respectivos controles en *DMEM20%* ( $1,06 \pm 0,03$ ). La expresión relativa de *OP* tendía a ser mayor en células que fueron estimuladas con medio osteogénico ( $7,05 \pm 0,26$ ) que en las células control sin estimular ( $1,00 \pm 0,00$ ).

#### 4.1.1.4. Diferenciación condrogénica de las células aisladas de médula ósea humana

La tinción con H-E demostró la capacidad de las células aisladas para formar micromasas con morfología redondeada. En el área interna de la micromasa las células sintetizaron una gran cantidad de MEC, rica en colágenos (Figura 17 A, TM), mientras que el área externa se mostraba altamente poblada con células pero su MEC era menos abundante (Figura 17 A, H-E).



**Figura 17.** Diferenciación condrogénica en micromasas de las células aisladas de MO humana. A) Imágenes de las tinciones e inmunotinciones de las células estimuladas y de las células control de: H-E, TM, SO, Col II, *Agg*, Col I, Col X y *MMP13*. Las imágenes de menor tamaño corresponden a las micromasas no estimuladas. B) NRE de los genes característicos de condrocitos, *SOX9*, *COL2* y *AGG*, y no característicos como el *COL1*. Condrog: micromasas cultivadas en medio condrogénico; Ctrl Condrog: micromasas cultivadas en medio *DMEM20%*. Aumento 100x.

Histológicamente, se pudo observar que las células estimuladas fueron capaces de diferenciarse hacia células similares a condrocitos ya que mostraron presencia de GAGs (tinción con SO), Col II y *Agg*, en la MEC.

Además, apenas se detectó positividad para Col I, Col X y *MMP13* en estas células, mientras que en las células no estimuladas la positividad fue mayor (Figura 17 A).

En el análisis de *qRT-PCR* (Figura 17 B) se encontró una tendencia al incremento de expresión de todos los genes característicos de condrocitos, en las células estimuladas con respecto a las control sin estimular: *SOX9* ( $3,52 \pm 0,16$ ;  $1,03 \pm 0,02$ , respectivamente), *COL2* ( $4,03 \pm 0,34$ ;  $1,26 \pm 0,26$ , respectivamente) y *AGG* ( $39,35 \pm 5,13$ ;  $1,27 \pm 0,22$ , respectivamente). Sin embargo, también se observó que la tendencia de expresión de *COL1* era mayor en las células estimuladas ( $0,96 \pm 0,04$ ) que en las células control ( $0,02 \pm 0,00$ ).

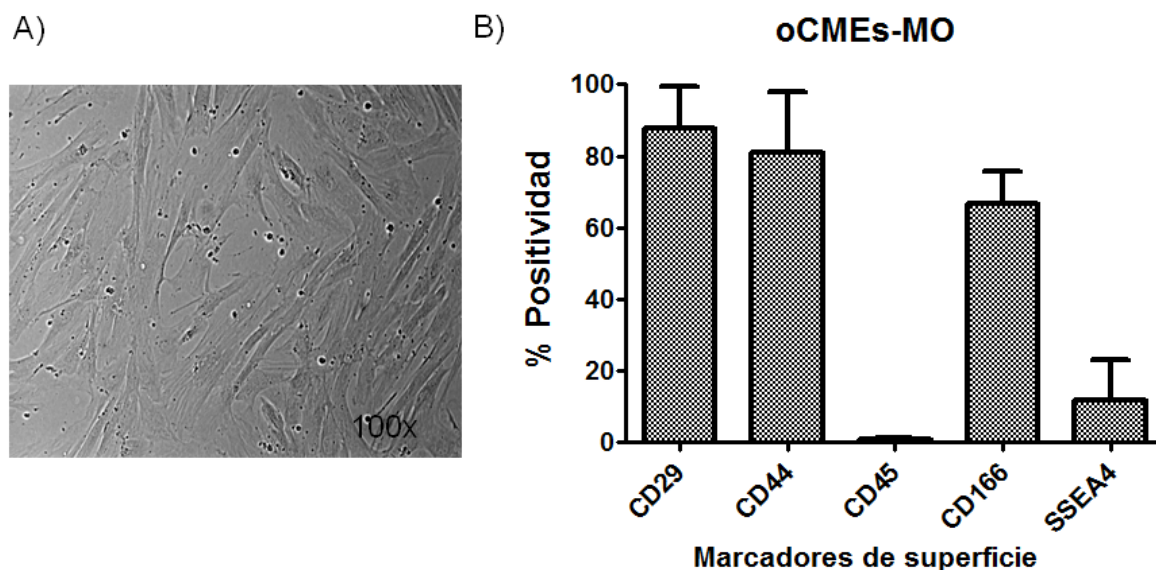
#### **4.1.2. Caracterización de las células aisladas de médula ósea ovina**

La población de oCMEs-MO aislada de aspirados de MO ovina mostró adherencia al plástico del frasco de cultivo. Estas células también mostraron morfología típica fibroblástica, característica de las CMEs, con citoplasma irregular y numerosas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 18 A). Las características de las oCMEs fueron muy similares a las descritas previamente en humanos.

##### **4.1.2.1. Expresión de marcadores de superficie en las células aisladas de médula ósea ovina**

Los análisis inmunofenotípicos se realizaron para testar la expresión de marcadores de CMEs y hematopoyéticos en las células aisladas. El perfil de expresión de las oCMEs-MO se muestra en la Figura 18 B. Aunque las oCMEs-MO tienen antígenos de superficie similares a las CMEs, la mayoría de los Ac utilizados que reaccionan con las células humanas no lo hicieron con las oCMEs (*CD69*, *CD73*, *CD105*, *CD106*, *CD271* y *STRO1* no mostraron reactividad). Sí se detectó positividad para *CD29* ( $87,58 \pm 11,70\%$ ), *CD166* ( $66,85 \pm 8,79\%$ ) y *SSEA4* ( $11,67 \pm 11,31\%$ ). Estas células también mostraron positividad para el Ac *CD44* específico de oveja ( $81,08 \pm 16,68\%$ ). Las oCMEs-MO no mostraron positividad para el Ac *CD45* específico de rata, aunque previamente había resultado positivo en sangre de oveja (datos no mostrados),

lo que indica que no había contaminación de células de origen hematopoyético (Figura 18 B).



**Figura 18.** Caracterización fenotípica de las células aisladas de MO ovina. A) Imagen obtenida al microscopio óptico de las células aisladas. B) Porcentajes de positividad obtenidos por las células aisladas para los marcadores de superficie, en los que se obtuvo reactividad de los Ac.

#### 4.1.2.2. Diferenciación adipogénica de las células aisladas de médula ósea ovina

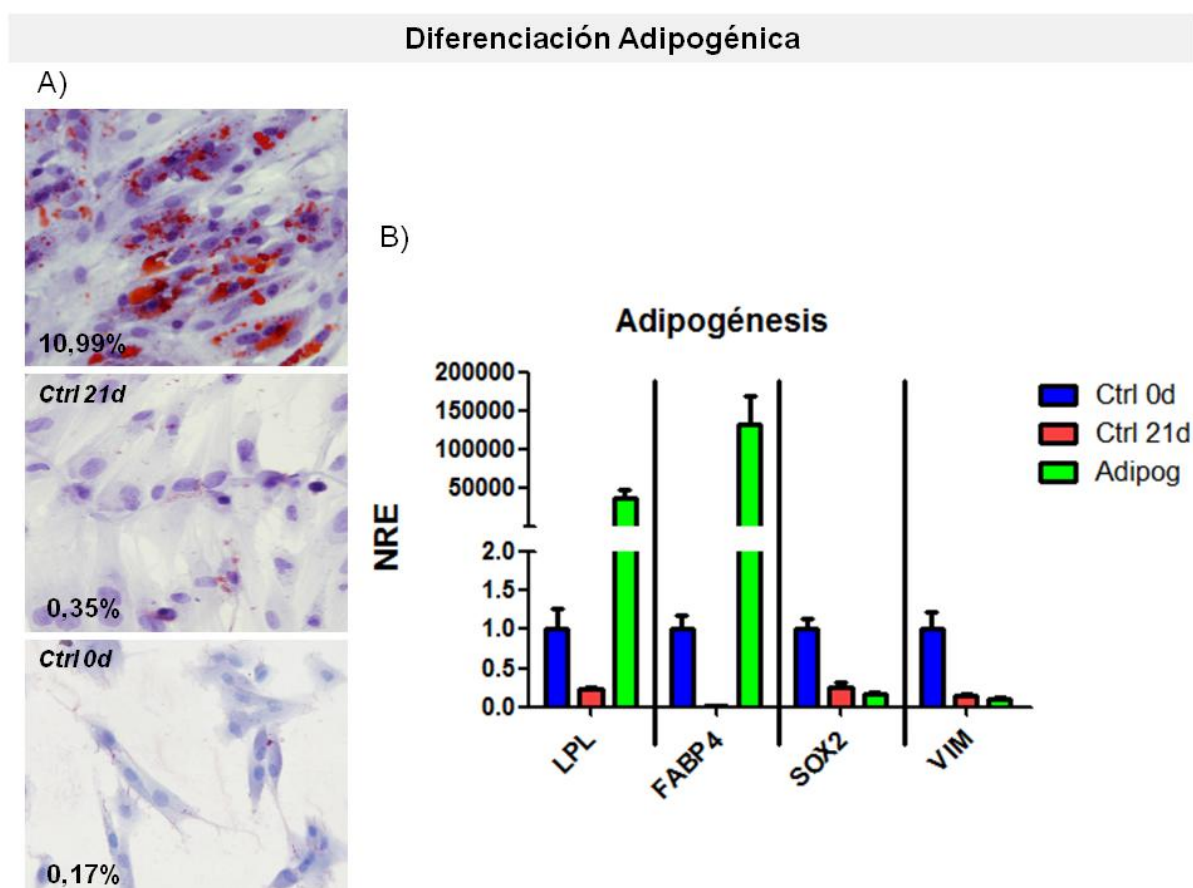
La diferenciación adipogénica se analizó mediante la tinción con *Oil Red O* a los días 0 y 21 de cultivo en medio adipogénico (Figura 19 A). El porcentaje de células positivas para tinción con *Oil Red O* fue significativamente mayor en oCMEs-MO estimuladas que en las no estimuladas ( $p$ -valor=0,00). Las células estimuladas durante 21 días presentaron un porcentaje de tinción de  $10,99 \pm 1,26\%$ . Las células no estimuladas, mantenidas 21 días en medio *DMEM20%*, mostraron un porcentaje de tinción bajo ( $0,35 \pm 0,07\%$ ) (Figura 19 A).

Con respecto a la tinción a 0 días de cultivo, el porcentaje de positividad fue de  $0,17 \pm 0,04\%$ , siendo significativamente menor que las estimuladas a 21 días ( $p$ -valor=0,00). No se encontraron diferencias significativas entre el control a día 0 y el control a 21 días en *DMEM20%* ( $p$ -valor=0,13).

La diferenciación adipogénica también se analizó mediante *qRT-PCR*. Las células estimuladas durante 21 días en medio adipogénico mostraron una

tendencia al incremento en los NRE de los genes *FABP4* ( $132900,00 \pm 35750,00$ ) y *LPL* ( $36870,00 \pm 10840,00$ ), comparado con las células a día 0 de diferenciación ( $1,00 \pm 0,17$ ; y  $1,00 \pm 0,27$ , respectivamente) (Figura 19 B).

Con respecto a la expresión de genes de indiferenciación, en las células estimuladas 21 días, los NRE de *VIM* y *SOX2* tendían a disminuir ( $0,10 \pm 0,02$  y  $0,15 \pm 0,02$ , respectivamente) comparado con la expresión a día 0, en donde los NRE de *VIM* y *SOX2* eran de  $1,00 \pm 0,21$  y  $1,00 \pm 0,13$  (Figura 19 B).



**Figura 19.** Diferenciación adipogénica de las células aisladas de MO ovina. A) Imágenes de la tinción con *Oil Red O* de las células estimuladas con medio adipogénico y de las células control, a 0 y 21 días. B) NRE de los genes característicos de adipocitos, *LPL* y *FABP4*, y de los genes de indiferenciación, *VIM* y *SOX2*. Ctrl 0d: control de células a 0 días de diferenciación; Ctrl 21d: control de células cultivadas 21 días en *DMEM*20%; Adipog: células cultivadas en medio de estimulación adipogénico. Aumento 200x.

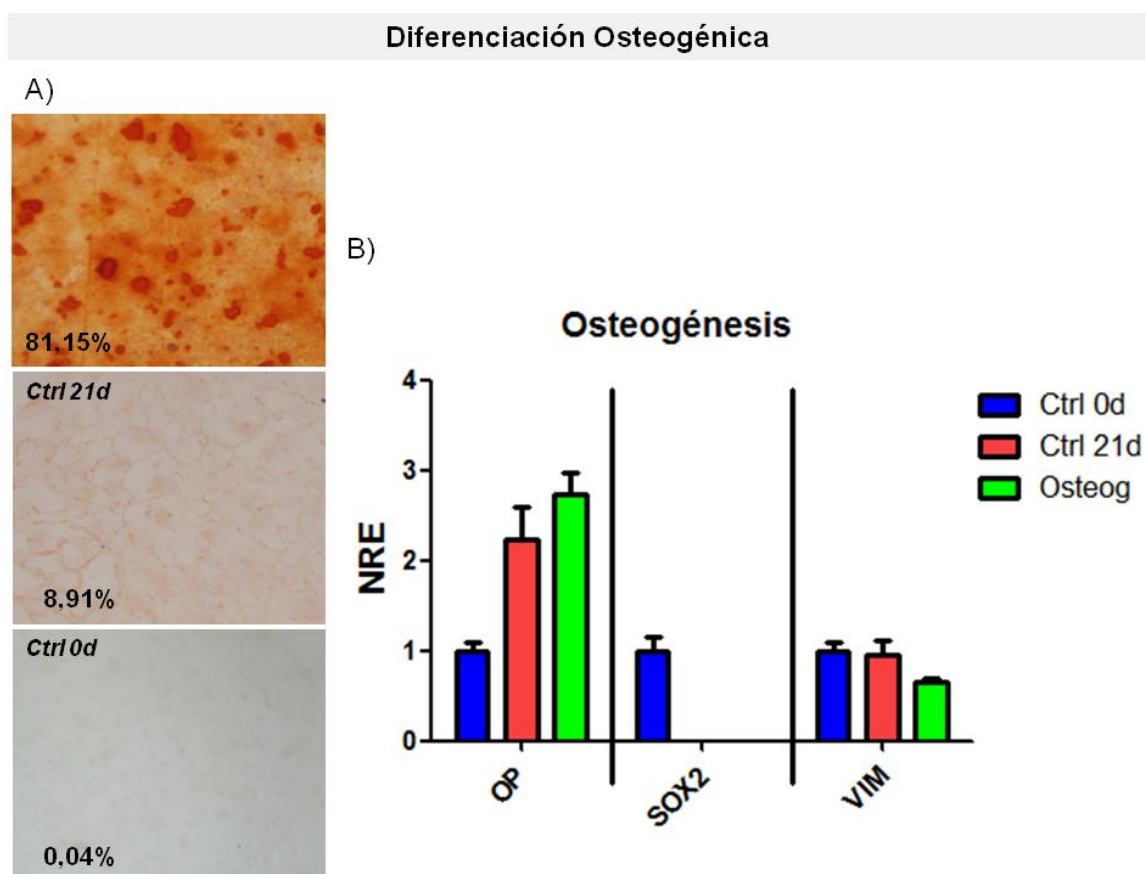
Las células cultivadas durante 21 días en medio *DMEM*20% mostraron una tendencia a la disminución en la expresión de *FABP4* ( $0,02 \pm 0,00$ ) y *LPL* ( $0,23 \pm 0,01$ ) con respecto a las células a día 0 de diferenciación. También mostraron



una disminución en la expresión de VIM ( $0,14 \pm 0,03$ ) y SOX2 ( $0,25 \pm 0,07$ ), comparado con las células a día 0 (Figura 19 B).

#### 4.1.2.3. Diferenciación osteogénica de las células aisladas de médula ósea ovina

Las células estimuladas 21 días mostraron depósitos cálcicos extracelulares ( $81,15 \pm 4,67\%$  positividad de tinción Rojo Alizarina) (Figura 20 A). Las células cultivadas 21 días en *DMEM20%* mostraron una ligera positividad ( $p$ -valor=0,00) para la tinción con Rojo Alizarina ( $8,91 \pm 5,68\%$ ). A día 0, el porcentaje de tinción fue todavía menor ( $0,04 \pm 0,01\%$ ) que en los cultivos a 21 días estimulados y sin estimular ( $p$ -valores<0,05) (Figura 20 A).



**Figura 20.** Diferenciación osteogénica de las células aisladas de MO ovina. A) Imágenes de la tinción con Rojo Alizarina de las células estimuladas con medio osteogénico y de las células control, a 0 y 21 días. B) NRE del gen característico de osteoblastos, OP, y de los genes de indiferenciación, VIM y SOX2. Ctrl 0d: control de células a 0 días de diferenciación; Ctrl 21d: control de células cultivadas 21 días en *DMEM20%*; Osteog: células cultivadas en medio de estimulación osteogénico. Aumento 200x.

La capacidad de diferenciación osteogénica también se testó mediante *qRT-PCR*. Las células estimuladas durante 21 días en medio osteogénico mostraron una tendencia al incremento en la expresión de OP ( $2,73 \pm 0,23$ ) comparado con las células a día 0 de diferenciación ( $1,00 \pm 0,10$ ). Con respecto a los genes de indiferenciación en las células estimuladas durante 21 días, los NRE de SOX2 ( $0,00 \pm 0,00$ ) y VIM ( $0,65 \pm 0,03$ ) fueron relativamente más bajos que en las células a día 0 ( $1,00 \pm 0,15$  y  $1,00 \pm 1,05$ , respectivamente) (Figura 20 B).

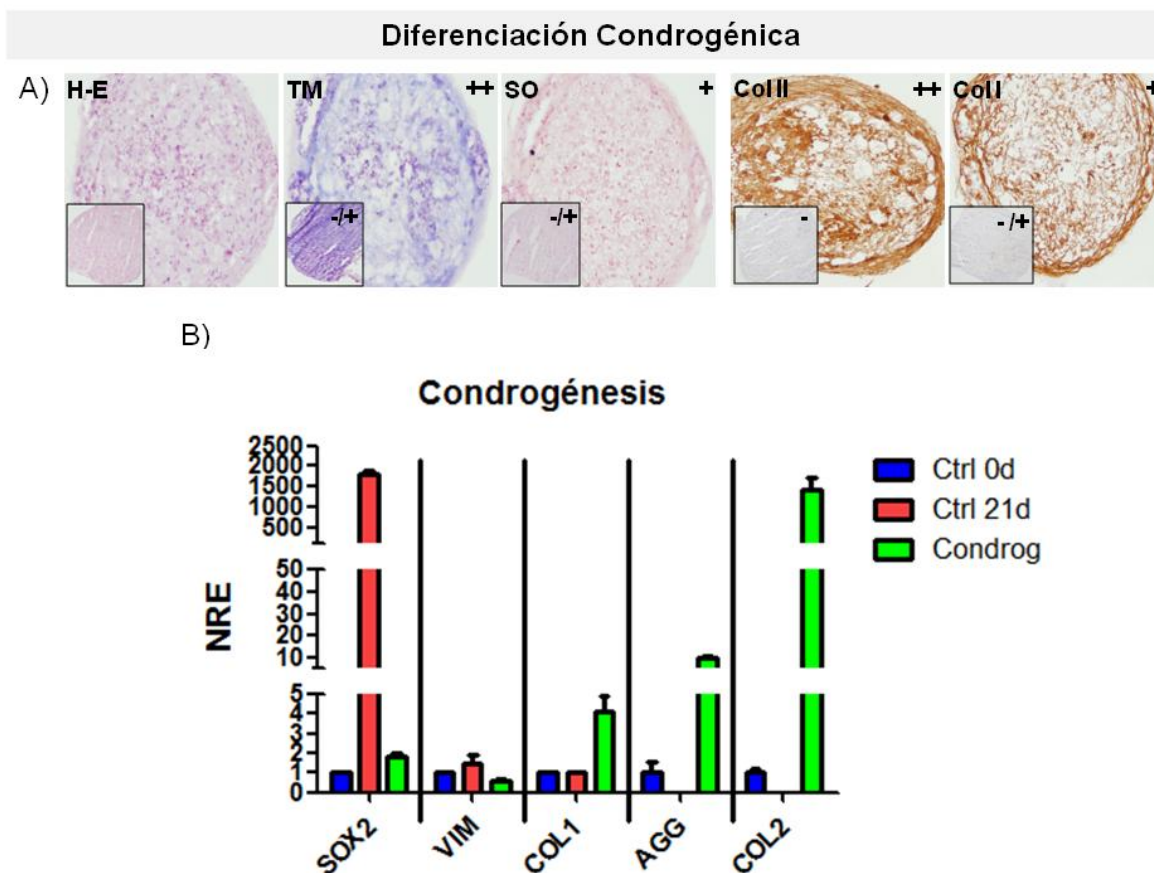
Las células cultivadas durante 21 días en medio control *DMEM20%* también mostraron una tendencia de incremento en la expresión de OP ( $2,23 \pm 0,35$ ), comparado con las células a día 0 de diferenciación ( $1,00 \pm 0,10$ ) (Figura 20 B). Con respecto a la expresión de los genes de indiferenciación, en las células cultivadas en *DMEM20%* 21 días, la expresión de VIM apenas varió con respecto a día 0 ( $0,96 \pm 0,16$ ). No se detectó expresión de SOX2 en las células cultivadas 21 días en *DMEM20%* (Figura 20 B).

#### **4.1.2.4. Diferenciación condrogénica de las células aisladas de médula ósea ovina**

En la diferenciación condrogénica, la tinción con H-E reveló la morfología redondeada de las micromasas. Las micromasas estimuladas mostraron mayor celularidad en el centro que las no estimuladas. Aunque ambas presentaron MEC, se detectó mayor tinción con TM y SO en las micromasas cultivadas en medio condrogénico que en las cultivadas en *DMEM20%* (Figura 21 A). Mediante inmunotinciones, también se detectó mayor presencia de Col I y II en las micromasas estimuladas (Figura 21 A).

La diferenciación condrogénica también se testó mediante *qRT-PCR*. Las oCMEs-MO diferenciadas, durante 21 días en medio condrogénico, mostraron una tendencia al incremento en la expresión de los genes AGG ( $9,88 \pm 0,75$ ), COL1 ( $4,14 \pm 0,81$ ) y COL2 ( $1428,00 \pm 293,20$ ), comparado con las células a día 0 de diferenciación ( $1,00 \pm 0,59$ ;  $1,00 \pm 0,05$  y  $1,00 \pm 0,16$ , respectivamente). Por otro lado, la expresión de SOX2 en las micromasas estimuladas 21 días ( $1,86 \pm 0,17$ ) estaba algo incrementada con respecto a día

0 ( $1,00 \pm 0,05$ ), mientras que los NRE de VIM ( $0,60 \pm 0,05$ ) tendían a estar disminuidos con respecto a día 0 ( $1,00 \pm 0,04$ ) (Figura 21 B).



**Figura 21.** Diferenciación condrogénica de las células aisladas de MO ovina. A) Imágenes de las tinciones e inmunotinciones de las micromasas estimuladas y de las control, cultivadas 21 días, de: H-E, TM, SO, Col II y Col I. Las imágenes de menor tamaño se corresponden con las micromasas no estimuladas. B) NRE, en las micromasas estimuladas y micromasas control tras 21 días y en el control a día 0, de los genes de indiferenciación (VIM y SOX2), de COL1 y de los genes característicos de condrocitos (COL2 y AGG). Ctrl 0d: control de células a 0 días de diferenciación; Ctrl 21d: control de células cultivadas 21 días en *DMEM*20%; Condrog: células cultivadas en medio de estimulación condrogénico. Aumento: imágenes grandes 200x e imágenes pequeñas 100x.

Las micromasas cultivadas 21 días en *DMEM*20% no mostraron ni expresión de AGG ni de COL2. Además, los NRE de COL1 no cambiaron con respecto a los obtenidos a día 0 de diferenciación. En cuanto a la expresión de los genes de indiferenciación en las micromasas cultivadas 21 días en *DMEM*20%, la tendencia de los NRE de VIM ( $1,50 \pm 0,44$ ) era de un ligero incremento cuando se compararon con células a día 0 ( $1,00 \pm 0,04$ ). Además, la expresión de SOX2 también estaba incrementada ( $1789,00 \pm 124,00$ ) en las micromasas cultivadas en *DMEM*20% (Figura 21 B).

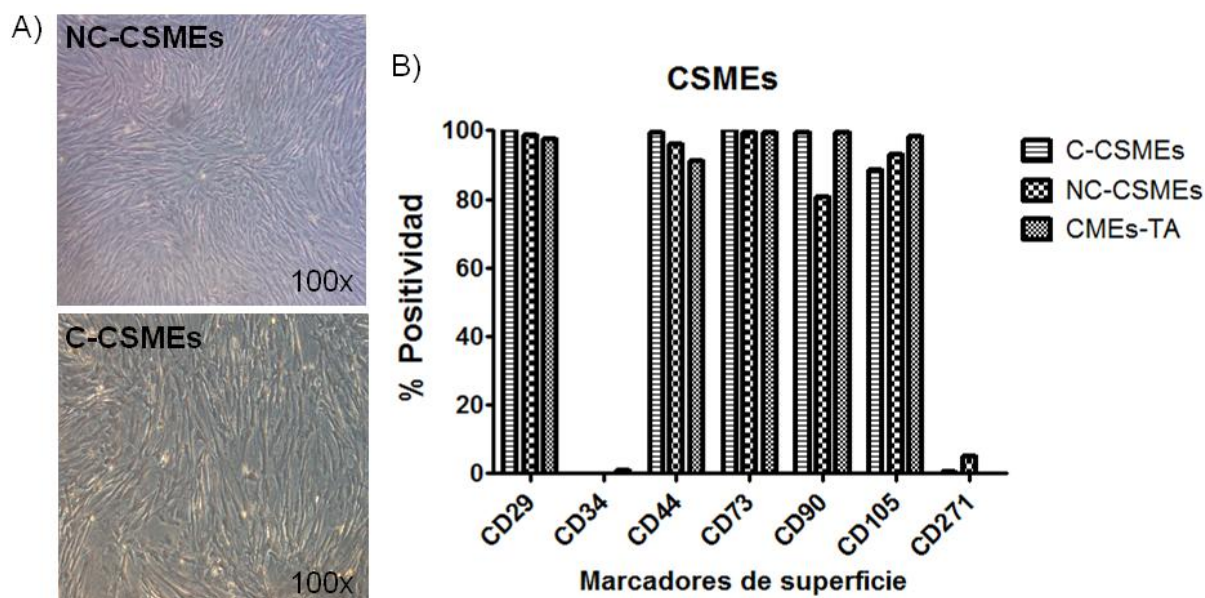


### 4.1.3. Caracterización de las células derivadas de células pluripotentes inducidas

Los cultivos de NC-CSMEs y de C-CSMEs formaron una monocapa homogénea de células con morfología fibroblástica (Figura 22 A).

#### 4.1.3.1. Expresión de marcadores de superficie en las células derivadas de células pluripotentes inducidas

Para comparar las CSMEs con las CMEs, se analizó el perfil de expresión de marcadores de superficie característicos. Las células mesenquimales estromales procedentes de tejido adiposo (CMEs-TA) expresaron marcadores de superficie típicos de CMEs, mostrando un alto porcentaje de positividad para CD29 ( $97,38 \pm 1,22\%$ ), CD44 ( $90,97 \pm 3,11\%$ ), CD73 ( $99,51 \pm 0,13\%$ ), CD90 ( $99,48 \pm 0,19\%$ ) y CD105 ( $98,29 \pm 0,36\%$ ) (Figura 22 B). Tanto las NC-CSMEs como las C-CSMEs mostraron valores similares para estos marcadores: CD29 ( $98,55 \pm 0,04\%$  y  $100,00 \pm 0,00\%$ , respectivamente), CD44 ( $95,84 \pm 0,91\%$  y  $99,50 \pm 0,20\%$ , respectivamente), CD73 ( $99,40 \pm 0,02\%$  y  $100,00 \pm 0,00\%$ , respectivamente), CD90 ( $80,70 \pm 18,06\%$  y  $99,50 \pm 0,40\%$ , respectivamente) y CD105 ( $92,98 \pm 6,22\%$  y  $88,61 \pm 11,29\%$ , respectivamente) (Figura 22 B).

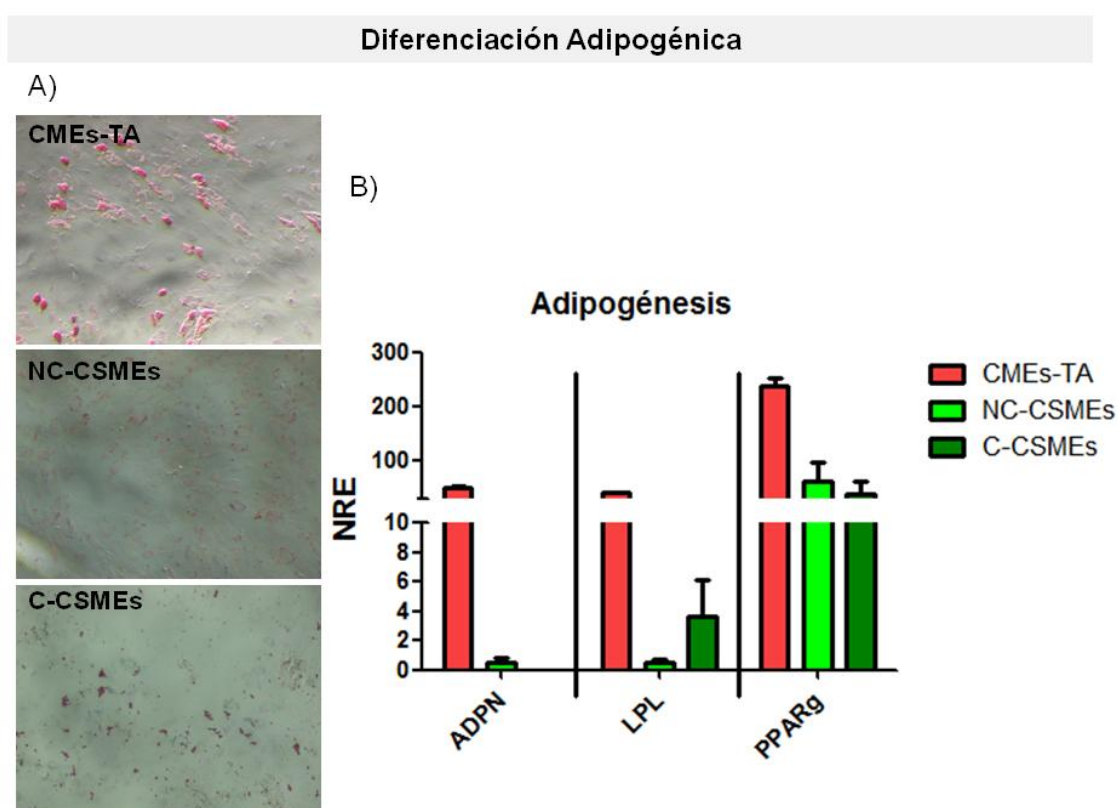


**Figura 22.** Caracterización fenotípica de las células derivadas de iPS, de forma no clonal (NC-CSMEs) y de forma pseudo-clonal (C-CSMEs), en comparación con las células mesenquimales estromales de tejido adiposo (CMEs-TA). A) Imagen obtenida al microscopio óptico de las células derivadas. B) Porcentajes de positividad obtenidos por las células para los marcadores de superficie.

Por otro lado, tanto en las CMEs-TA como en las C-CSMEs no se detectó positividad para los marcadores CD34 y CD271. Sin embargo, en las NC-CSMEs se detectó un porcentaje bajo de CD271 ( $5,16 \pm 2,03\%$ ), aunque no para CD34 ( $0,00 \pm 0,00\%$ ) (Figura 22 B).

#### 4.1.3.2. Diferenciación adipogénica de las células derivadas de células pluripotentes inducidas

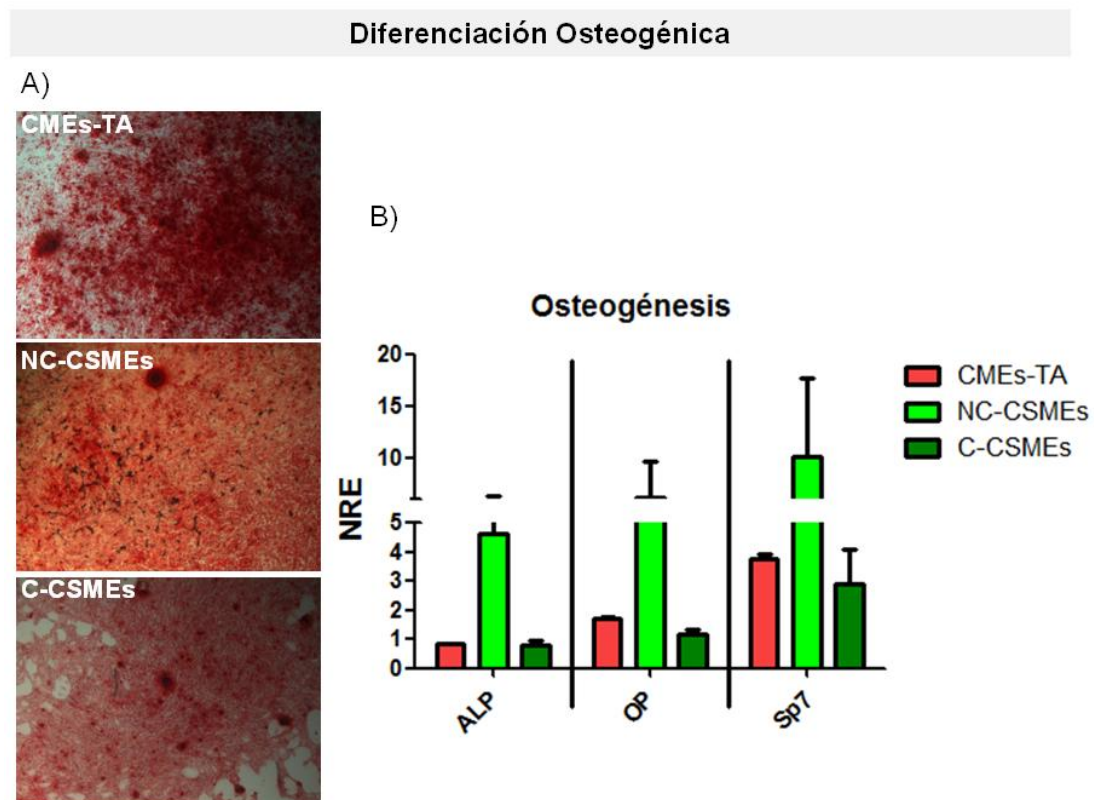
Tras 21 días de diferenciación, tanto las NC-CSMEs como las C-CSMEs mostraron una positividad débil con la tinción de *Oil Red O*, mientras que las CMEs-TA mostraron una abundante acumulación de vacuolas lipídicas positivas para la tinción (Figura 23 A). Además, las CMEs-TA mostraron una tendencia a expresar mayores NRE de genes típicos adipocíticos como ADPN ( $50,51 \pm 1,94$ ), LPL ( $43,17 \pm 0,29$ ) y *PPARg* ( $238,90 \pm 13,40$ ) que las CSMEs. Las NC-CSMEs apenas expresaron ADPN ( $0,53 \pm 0,32$ ) y LPL ( $0,50 \pm 0,26$ ), aunque sí expresaron *PPARg* ( $62,89 \pm 35,80$ ) (Figura 23 B). Los NRE de los tres genes fueron muy bajos en las C-CSMEs (Figura 23 B).



**Figura 23.** Diferenciación adipogénica de las CMEs-TA, las NC-CSMEs y las C-CSMEs. A) Imágenes de la tinción con *Oil Red O* de las células estimuladas con medio adipogénico (aumento 80x). B) NRE de los genes característicos de adipocitos, ADPN, LPL y *PPARg*.

#### 4.1.3.3. Diferenciación osteogénica de las células derivadas de células pluripotentes inducidas

En cuanto a la capacidad de diferenciación osteogénica, tanto las NC-CSMEs como las CMEs-TA presentaron una positividad alta para la tinción con Rojo Alizarina, tras 21 días de estimulación osteogénica (Figura 24 A). Sin embargo, los NRE de genes típicos osteogénicos fueron mayores en las NC-CSMEs que en las CMEs-TA (Figura 24B). Mediante tinción con Rojo Alizarina apenas se observó presencia de depósitos cálcicos en las C-CSMEs estimuladas 21 días (Figura 24 A). A pesar de ello, los NRE de los genes *ALP*, *OP* y *Sp7* presentaron una tendencia similar en C-CSMEs ( $0,79 \pm 0,18$ ;  $1,19 \pm 0,11$ ;  $2,89 \pm 1,16$ , respectivamente) que en las CMEs-TA ( $0,86 \pm 0,00$ ;  $1,73 \pm 0,02$ ;  $3,79 \pm 0,12$ , respectivamente) (Figura 24 B). Los NRE en las NC-CSMEs mostraron una tendencia mayor en la expresión para *ALP* ( $4,65 \pm 1,74$ ), *OP* ( $6,16 \pm 3,51$ ) y *Sp7* ( $10,04 \pm 7,68$ ) (Figura 24 B), con respecto a los otros dos tipos celulares.

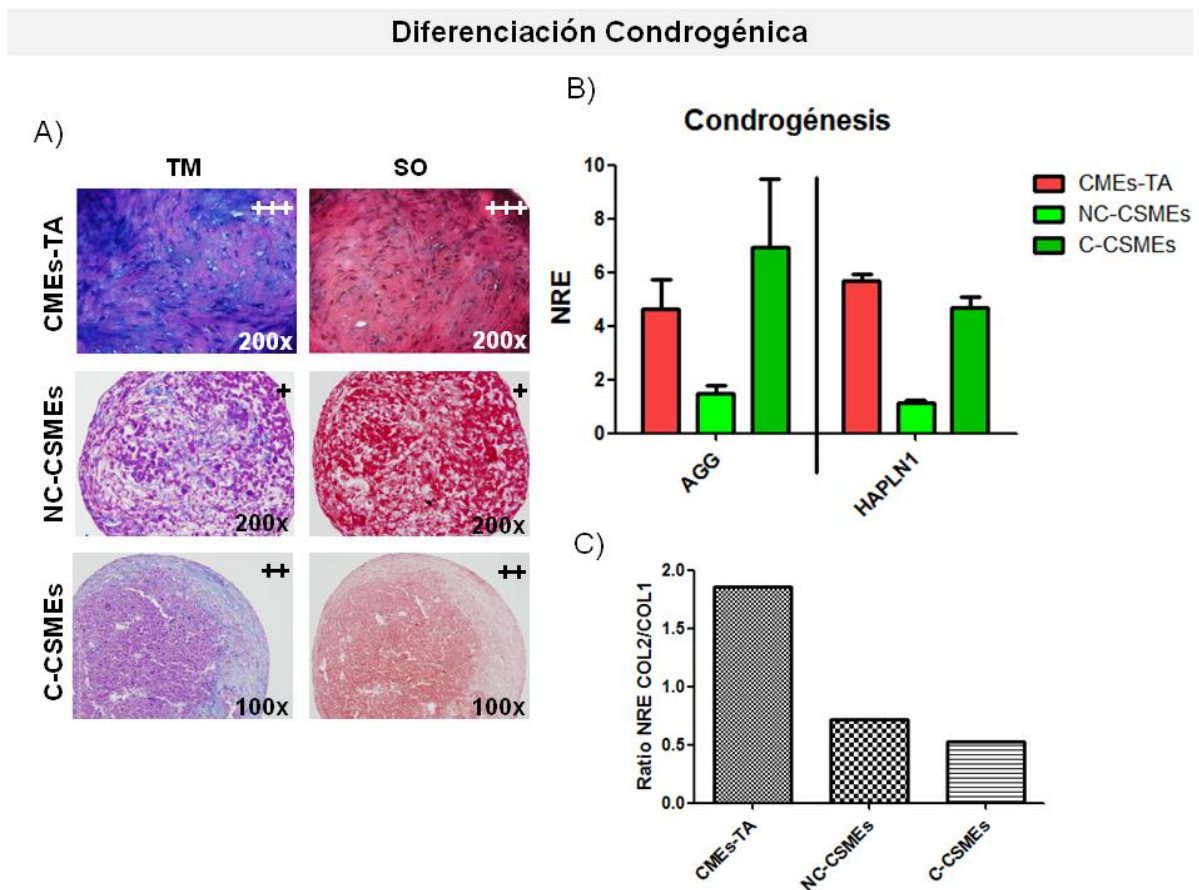


**Figura 24.** Diferenciación osteogénica de las CMEs-TA, las NC-CSMEs y las C-CSMEs. A) Imágenes de la tinción con Rojo Alizarina de las células estimuladas con medio osteogénico (aumento 20x). B) NRE de los genes característicos de osteoblastos, *OP*, *ALP* y *Sp7*.

#### 4.1.3.4. Diferenciación condrogénica de las células derivadas de células pluripotentes inducidas

Tras 21 días de estimulación condrogénica, las micromasas de las CMEs-TA presentaron una tinción más intensa y homogénea con TM (Figura 25 A). Tanto las NC-CSMEs como las C-CSMEs mostraron mayor tinción con TM y SO en la periferia de la micromasa que en la zona central (Figura 25 A).

En cuanto a la expresión génica, los NRE de las C-CSMEs para *AGG* ( $6,91 \pm 2,57$ ) y *HAPLN1* ( $4,66 \pm 0,42$ ) mostraron tendencias similares a los NRE en CMEs-TA ( $4,62 \pm 1,10$  y  $5,68 \pm 0,26$ , respectivamente). Sin embargo, en las NC-CSMEs los NRE fueron menores ( $1,47 \pm 0,29$  y  $1,16 \pm 0,08$ , respectivamente) (Figura 25 B). Las CMEs-TA presentaron un mejor ratio COL2/COL1 que las CSMEs (Figura 25 C).



**Figura 25.** Diferenciación condrogénica de las CMEs-TA, las NC-CSMEs y las C-CSMEs. A) Imágenes de las tinciones con TM y SO de las micromasas estimuladas con medio condrogénico. B) NRE de los genes característicos de condrocitos (*AGG* y *HAPLN1*). C) Ratio de los NRE de COL2/COL1.

## 4.2. Evaluación de los constructos condrogénicos humanos

### 4.2.1. Evaluación de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato

#### 4.2.1.1. Análisis celular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato

- **Localización, viabilidad y proliferación de las células en los constructos**

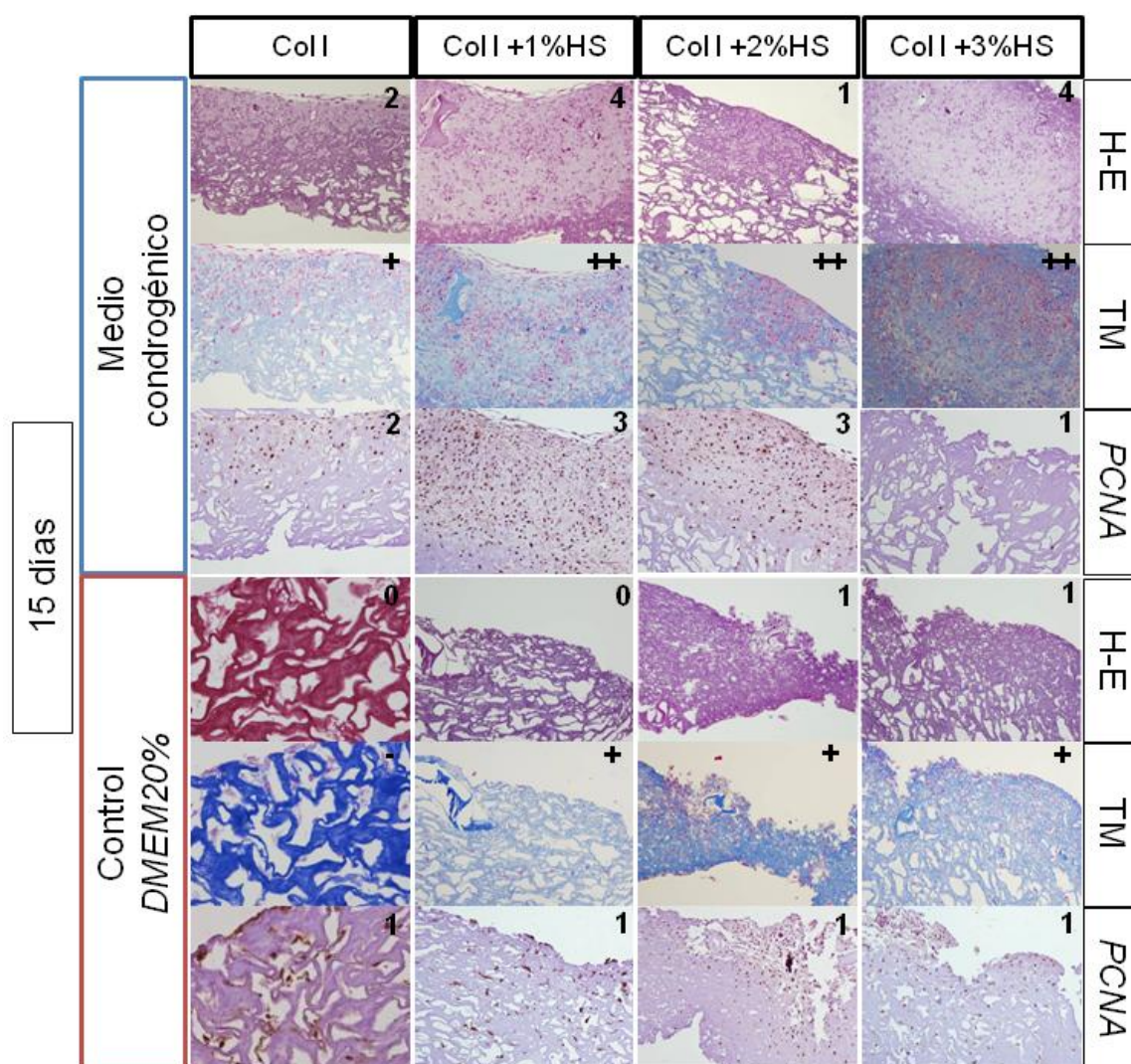
Para estudiar el porcentaje de células (con respecto al área de biomaterial analizado), la localización y la morfología celular, se interpretaron los resultados obtenidos con las tinciones de H-E y TM de forma conjunta (Figuras 26 y 27). En los constructos condrogénicos las células se localizaron en la superficie y en el interior de los soportes, mientras que en los constructos cultivados en *DMEM*20%, las células se localizaron mayoritariamente en la superficie (Figuras 26 y 27).

En la evaluación de los constructos cultivados en medio condrogénico se detectaron una gran cantidad de células y MEC, rica en colágenos, en todos los casos. Tras 15 días en medio condrogénico, se detectó mayor celularidad en los biomateriales de Col I +1%HS (> 80%) y Col I +3%HS (> 75%) (Figura 26, Tabla 4 - Anexo III). Tras 30 días, todos los constructos estimulados mostraron una distribución homogénea de la MEC, así como de las células (>80% en el total del biomaterial). El biomaterial de Col I +3%HS mostró el mayor porcentaje de células: 90% (Figura 27, Tabla 4 - Anexo III).

Con respecto a los controles sin estimular (cultivados en *DMEM*20%) a 15 días, el porcentaje de células observado fue bajo: <1% en Col I y Col I +1%HS, >10% en Col I +2%HS y >5% en Col I +3%HS (Figura 26, Tabla 4 - Anexo III). Tras 30 días de cultivo de los controles, en *DMEM*20%, el biomaterial de Col I estaba altamente biodegradado y se detectó <1% de células, pero no se detectó MEC. En los restantes biomateriales, sólo Col I +1%HS aumentó el porcentaje de células, con respecto al cultivo a 15 días (Figura 27, Tabla 4 - Anexo III).



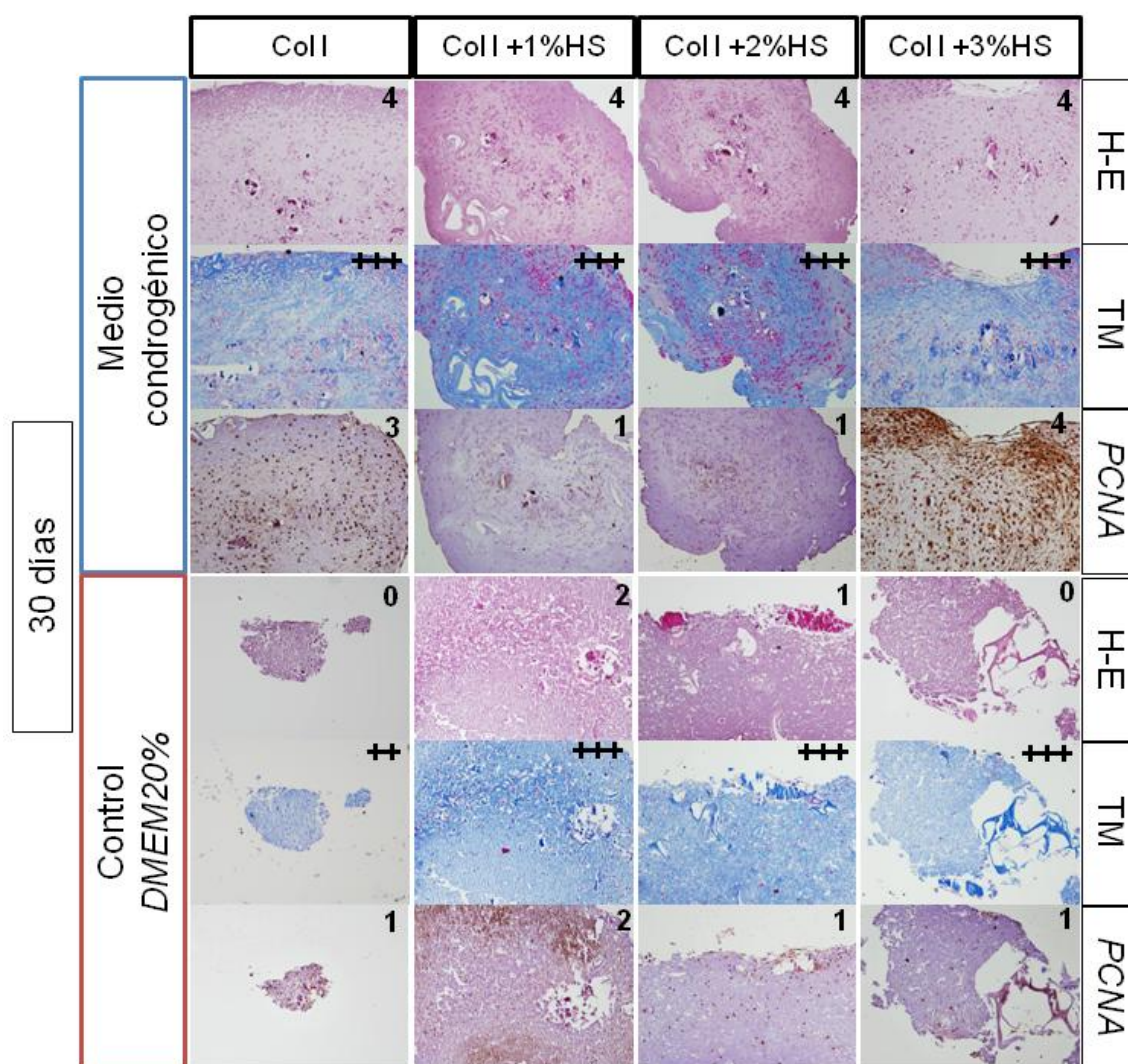
Los biomateriales con CMEs-MO cultivadas en medio condrogénico, mostraron la presencia de agregados de células ovaladas/redondeadas, en los dos tiempos analizados, excepto en Col I +2%HS (Figuras 26 y 27). En los biomateriales con CMEs-MO cultivadas 30 días en medio *DMEM*20%, las células mostraron una morfología fibroblástica y señales de necrosis, excepto en Col I +1%HS (Figura 27).



**Figura 26.** Imágenes de las tinciones (filas) de H-E, TM e inmunotinciones con *PCNA* de los constructos cultivados durante 15 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM*20%). En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x.

Para estudiar la viabilidad de estas células tras 15 y 30 días de cultivo sobre los biomateriales, se testó la presencia del marcador de proliferación *PCNA* mediante inmunotinción. Tras 15 días, el porcentaje de tinción fue bajo en los controles no diferenciados (Figura 26, Tabla 4 - Anexo III). En

los constructos estimulados, el porcentaje fue  $>25\%$  en Col I,  $<25\%$  en Col I +3%HS y  $>50\%$  en el resto (Col I +1%HS y Col I +2%HS) (Figura 26, Tabla 4 - Anexo III), indicando una alta proliferación. Tras 30 días, apenas se pudo detectar este antígeno en los controles  $<30\%$  (Figura 27, Tabla 4 - Anexo III). Sin embargo, en los constructos estimulados de Col I y Col I +3%HS los porcentajes de tinción fueron  $>60\%$ , por lo que hubo un incremento con respecto al día 15 (Figuras 26 y 27, Tabla 4 - Anexo III). Los biomateriales compuestos de Col I +1%HS y Col I +2%HS mostraron un porcentaje más bajo tras 30 días ( $<25\%$ ) que tras 15 días (Figuras 26 y 27, Tabla 4 - Anexo III).

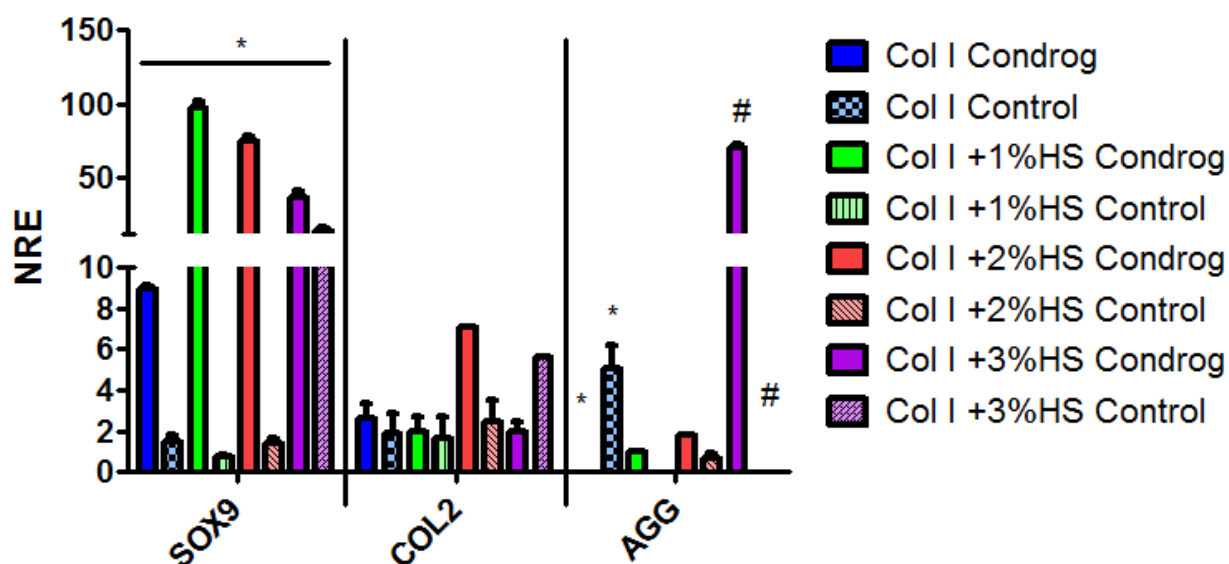


**Figura 27.** Imágenes de las tinciones (filas) de H-E, TM e inmunotinciones con PCNA de los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico y medio control (DMEM20%). En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x.

- **Perfil molecular de las células diferenciadas sobre los constructos**

Los datos mostraron que las células, tras 30 días de cultivo, expresaron SOX9, AGG y COL2 en la mayoría de los constructos (Figura 28).

En todos los constructos, los NRE de SOX9 fueron mayores en las células que estaban cultivadas en medio condrogénico (Col I  $8,98 \pm 0,16$ ; Col I +1%HS  $98,00 \pm 3,78$ ; Col I +2%HS  $75,57 \pm 3,52$ ; Col I +3%HS  $37,34 \pm 3,96$ ) que aquellas que no se estimularon (Col I  $1,45 \pm 0,32$ ; Col I +1%HS  $0,72 \pm 0,13$ ; Col I +2%HS  $1,40 \pm 0,22$ ; Col I +3%HS  $14,88 \pm 2,51$ ) ( $p$ -valores $<0,05$ ).



**Figura 28.** NRE de los genes característicos de condrocitos SOX9, COL2 y AGG, en los constructos condrogénicos y control, tras 30 días de cultivo. \*, # Diferencias significativas.

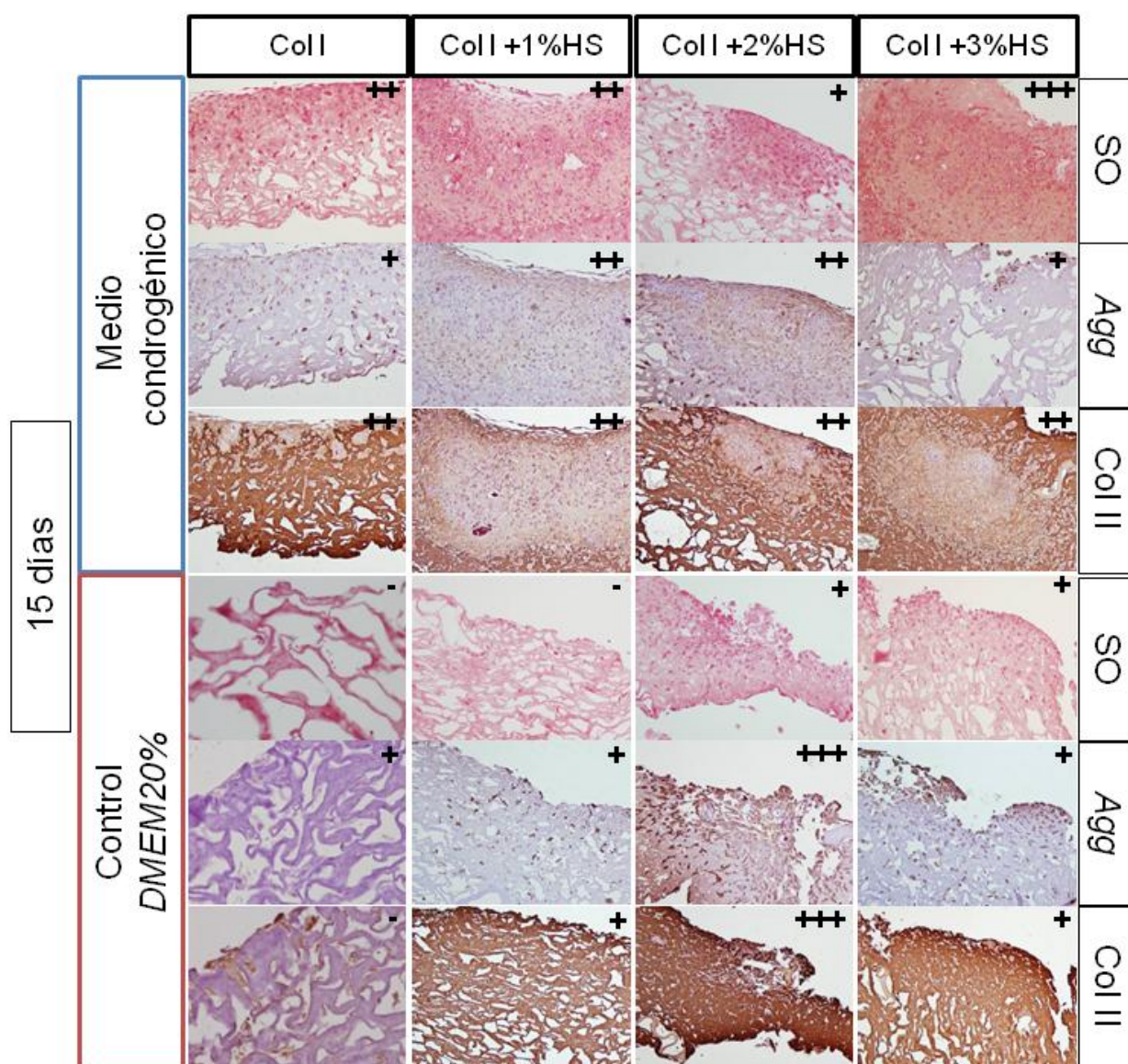
No se encontraron diferencias en los NRE de AGG ( $p$ -valores $>0,05$ ), excepto en los constructos de Col I y Col I +3%HS. En Col I, las células no estimuladas mostraron mayor expresión de AGG ( $5,03 \pm 1,17$ ) que las estimuladas ( $0,00 \pm 0,00$ ) ( $p$ -valor=0,03) (Figura 28). En Col I +3%HS, los NRE de AGG fueron mayores en los constructos estimulados ( $70,76 \pm 2,29$ ) que en los controles ( $0,00 \pm 0,00$ ) ( $p$ -valor=0,04) (Figura 28). No se encontraron diferencias en los NRE de COL2 entre ninguno de los grupos de estudio ( $p$ -valores $>0,05$ ) (Figura 28).



#### 4.2.1.2. Análisis de la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato

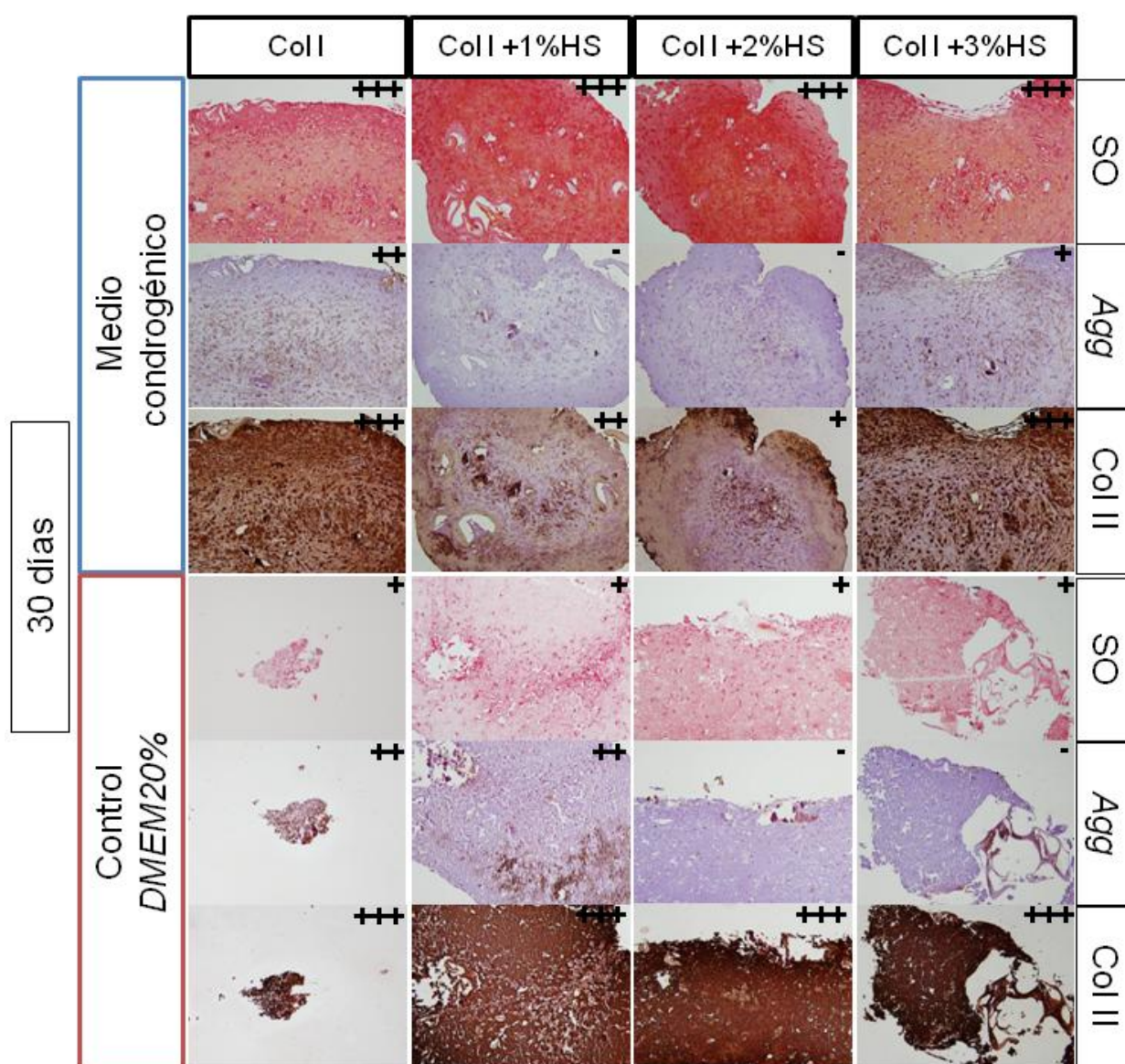
- Estudio de componentes característicos de la matriz extracelular de los condrocitos

La tinción con SO mostró una baja cantidad de PGs sulfatados en los constructos de Col I +3%HS y Col I +2%HS tras 15 días en cultivo en *DMEM*20%. Mientras que en los constructos de Col I y Col I +1%HS no se detectó metacromasia (Figura 29, Tabla 4 - Anexo III).



**Figura 29.** Estudio de componentes característicos de la MEC de condrocitos, en los constructos cultivados durante 15 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM*20%). Imágenes de la tinción (filas) de SO e inmunotinciones con Agg y Col II; en las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x.

Tras 30 días de cultivo, todos los constructos no estimulados mostraron metacromasia débil, lo que indica un leve incremento de la presencia de PGs en la MEC (Figura 30, Tabla 4 - Anexo III). En los soportes en los que se estimularon las células, se detectó positividad débil en Col I +2%HS, moderada en Col I y Col I +1%HS y fuerte en Col I +3%HS (Figura 29, Tabla 4 - Anexo III), tras 15 días de cultivo. Tras 30 días, la tinción con SO mostró una fuerte metacromasia en todos los constructos condrogénicos (Figura 30, Tabla 4 - Anexo III).



**Figura 30.** Estudio de componentes característicos de la MEC de condrocitos, en los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM20%*). Imágenes de la tinción (filas) de SO e inmunotinciones con Agg y Col II; en las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x.

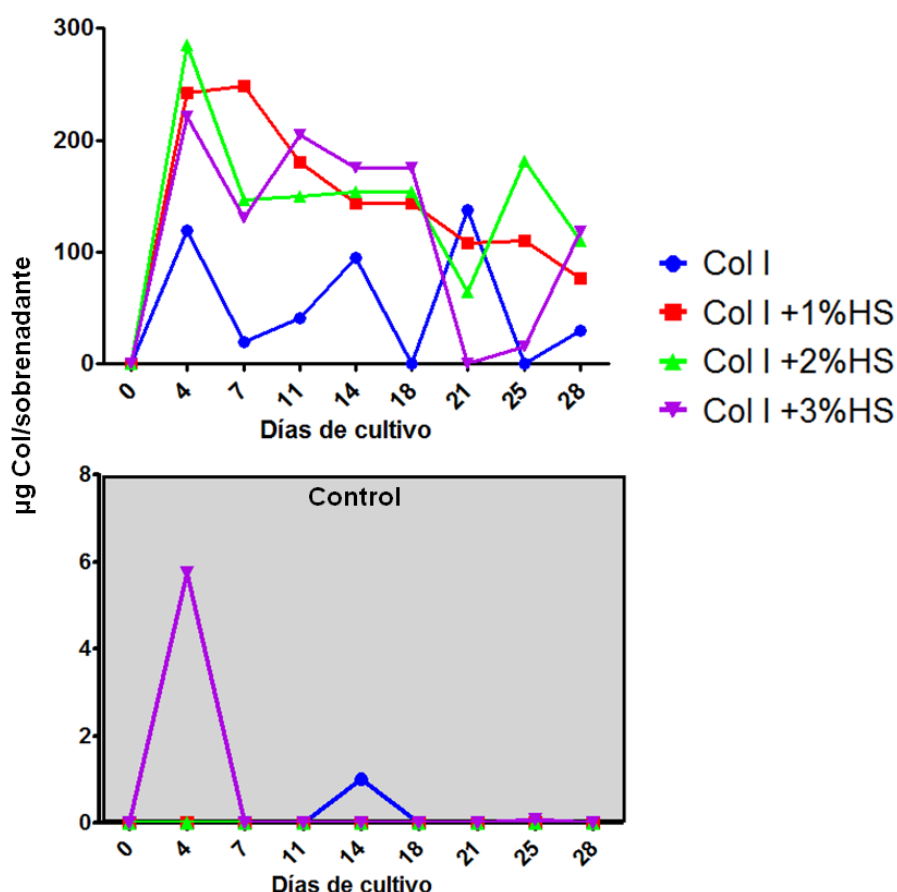
El análisis inmunohistoquímico para detectar la presencia de *Agg* en la MEC de los constructos, mostró su presencia en todos los grupos a los 15 días, tanto en *DMEM*20% como en medio condrogénico (Figura 29, Tabla 4 - Anexo III). Col I +2%HS en medio control fue el que mostró mayor positividad a los 15 días. Tras 30 días, la positividad de *Agg* fue moderada en Col I, estimulado y no estimulado y también en Col I +1%HS sin diferenciar (Figura 30, Tabla 4 - Anexo III). Los constructos de Col I +1%HS y Col I +2%HS estimulados y los controles de Col I +2%HS y Col I +3%HS, no mostraron positividad para la inmunotinción con *Agg*. Se detectó positividad débil en los constructos condrogénicos de Col I +3%HS.

Los análisis inmunohistoquímicos para testar el Col II en la MEC mostraron positividad en todos los soportes estudiados, excepto en el Col I en medio control a 15 días. La positividad fue moderada en los constructos estimulados, tras 15 días, aumentando hasta fuerte tras 30 días de cultivo en Col I y Col I +3%HS (Figuras 29 y 30, Tabla 4 - Anexo III). En los constructos no diferenciados a los 15 días de cultivo, el Col II no se detectó en los constructos de Col I, se detectó positividad débil en Col I +1%HS y Col I +3%HS, mientras que la positividad fue fuerte en Col I +2%HS. Tras 30 días, la positividad del Col II fue fuerte en todos los constructos, salvo en Col I +1%HS y Col I +2%HS estimulados en los que la positividad fue mayor en los constructos sin estimular (Figura 30, Tabla 4 - Anexo III).

Como se muestra en la Figura 31, las células de los constructos cultivados en medio condrogénico liberaron Col al sobrenadante en todos los tiempos analizados, excepto del día 14 al 18 de cultivo en los soportes de Col I, y del día 18 al 21 en los soportes de Col I +3%HS, en cuyos intervalos de tiempo no se detectó Col en los sobrenadantes del cultivo. Ha sido posible detectar una ligera tendencia a decrecer en la concentración de los sobrenadantes de los soportes de Col I y HS a lo largo del tiempo de cultivo. Esta tendencia decreciente fue más gradual y constante en Col I +1%HS. Col I +2%HS presentó la concentración inicial más alta pero, desde el día 18 al 21 se mostró una disminución, seguida de un incremento final entre los días 21 y 25 (Figura 31). Finalmente, los sobrenadantes de Col I +3%HS presentaron una concentración estable que no varió significativamente hasta los días 18-21 de cultivo, en los que no se detectó



Col en el sobrenadante y posteriormente se incrementó en los últimos días de cultivo (días 25 a 28) (Figura 31). Con respecto a los sobrenadantes de los constructos de Col I, la concentración de Col osciló considerablemente y, en la mayoría de los días analizados, obtuvo el valor de concentración más bajo con respecto al resto de soportes.



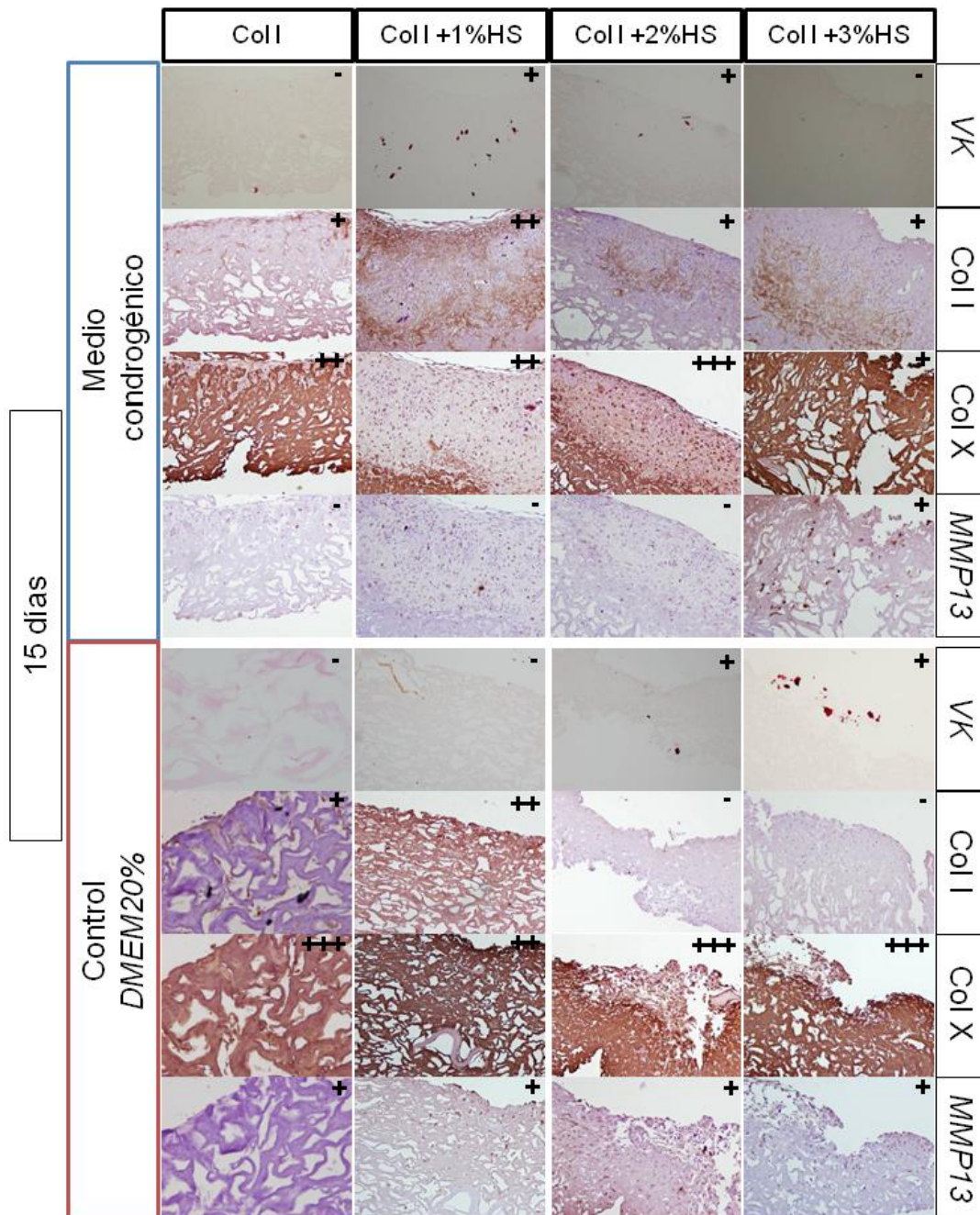
**Figura 31.** Gráfico de la liberación de Col (µg) a los sobrenadantes de los cultivos de los diferentes constructos, entre los días 0-28 de cultivo, en medio condrogénico y medio control (*DMEM20%*).

Por otro lado, los análisis realizados a los sobrenadantes de las células en los constructos cultivados en *DMEM20%*, no mostraron liberación de Col. En algunos casos excepcionales se detectó una liberación poco significativa de Col, entre los días 11-18 para Col I y entre los días 0-7 y 21-28 de Col I +3%HS (Figura 31).

Por lo tanto, la concentración de Col en los sobrenadantes fue significativamente mayor ( $p$ -valor<0,05) en los de los constructos cultivados en medio condrogénico que los de los cultivados en *DMEM20%*.

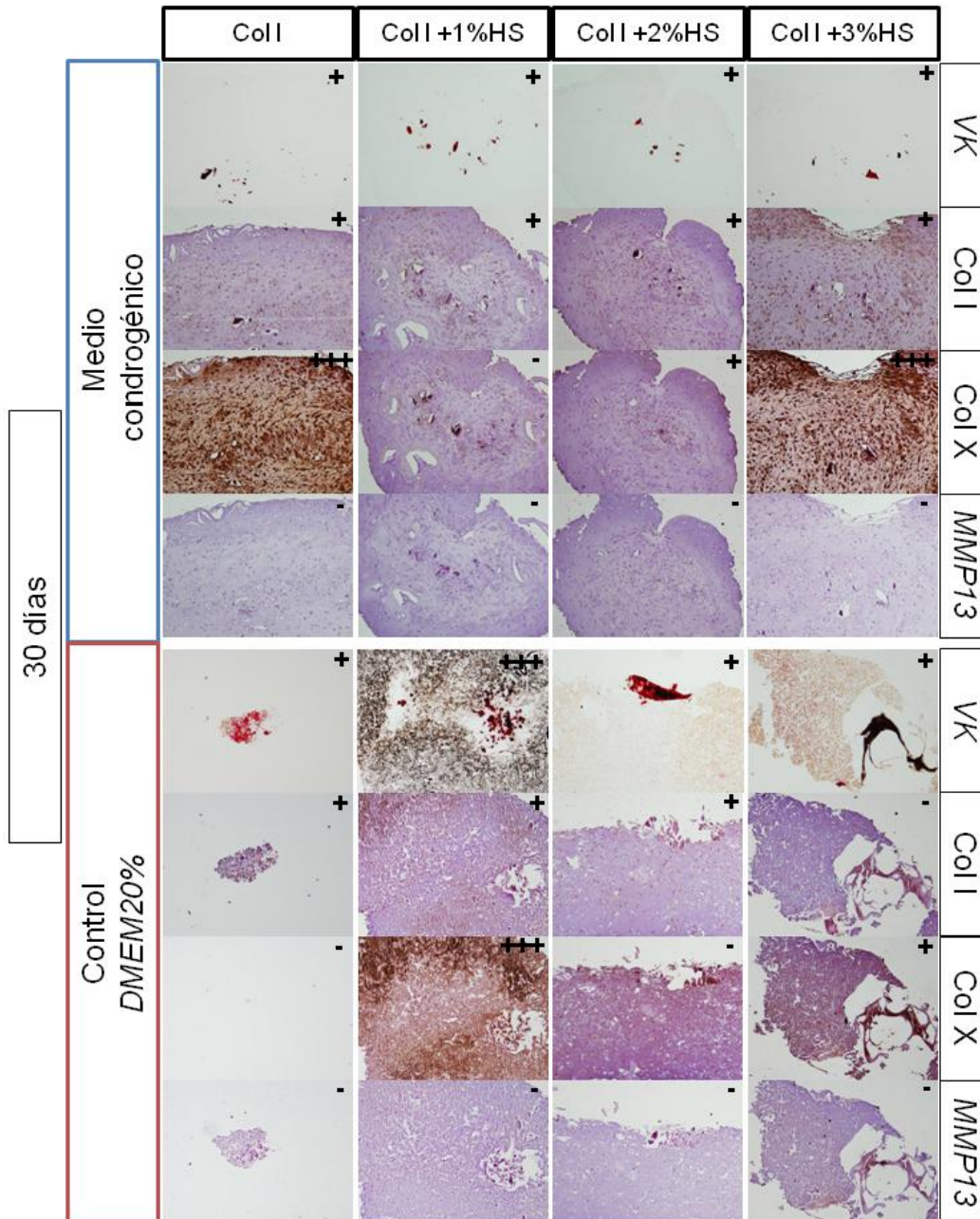
- **Estudio de otros componentes de la matriz extracelular**

La positividad para VK fue débil, tras 15 días, en los constructos sin diferenciar de Col I +2%HS y Col I +3%HS y en los diferenciados de Col I +1%HS y Col I +2%HS (Figura 32). No se detectó VK en Col I y Col I +1%HS cultivado en *DMEM*20% y en Col I y Col I +3%HS cultivado en medio condrogénico (Figura 32, Tabla 4 - Anexo III).



**Figura 32.** Estudio de otros componentes en la MEC de los constructos cultivados durante 15 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM*20%). Imágenes de la tinción (filas) de VK e inmunotinciones con Col I, Col X y *MMP13*. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x.

Por otro lado, los constructos estimulados durante 30 días en cultivo, mostraron una positividad débil en todos los casos, indicando un leve incremento desde el día 15 de cultivo en Col I y Col I +3%HS (Figura 33, Tabla 4 - Anexo III). Respecto a los constructos control sin estimular, la positividad para *VK* se mantuvo débil en todos los constructos tras 30 días, excepto en Col I +1%HS el cual mostró mayor tinción (desde ausente a 15 días a fuerte en 30) (Figura 33, Tabla 4 - Anexo III).



**Figura 33.** Estudio de otros componentes en la MEC en los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico y medio control (*DMEM20%*). Imágenes de la tinción (filas) de *VK* e inmunotinciones con Col I, Col X y *MMP13*. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I, Col I +1%HS, Col I +2%HS y Col I +3%HS. Aumento 100x.

También se estudió la presencia de Col I mediante inmunotinción. Los controles sin diferenciar mostraron desde ausencia en Col I +2%HS y Col I +3%HS a los 15 días, hasta débil en Col I o moderado en Col I +1%HS (Figuras 32). En cuanto a los constructos condrogénicos, éstos presentaron positividad leve, a ambos tiempos de estudio, excepto en Col I +1%HS 15 días (Figuras 32 y 33, Tabla 4 - Anexo III).

Respecto al Col X, los análisis inmunohistoquímicos mostraron una intensidad fuerte a los 15 días en Col I +2%HS estimulado y control y en Col I y Col I +3%HS control (Figura 32, Tabla 4 - Anexo III). En Col I y Col I +1%HS estimulados y Col I +1%HS en *DMEM*20% la positividad fue moderada. En cuanto a Col I +3%HS condrogénico la tinción para Col X fue débil (Figura 32, Tabla 4 - Anexo III). Tras 30 días en *DMEM*20%, la positividad aumentó de moderada a fuerte en Col I +1%HS y disminuyó en Col I, Col I +2%HS y Col I +3%HS (Figura 33, Tabla 4 - Anexo III). Por otro lado, los constructos estimulados de Col I y Col I +3%HS sufrieron un incremento de positividad (de 15 días a 30), mientras que el resto de constructos cultivados en medio condrogénico mostraron una disminución (Figuras 32 y 33, Tabla 4 - Anexo III).

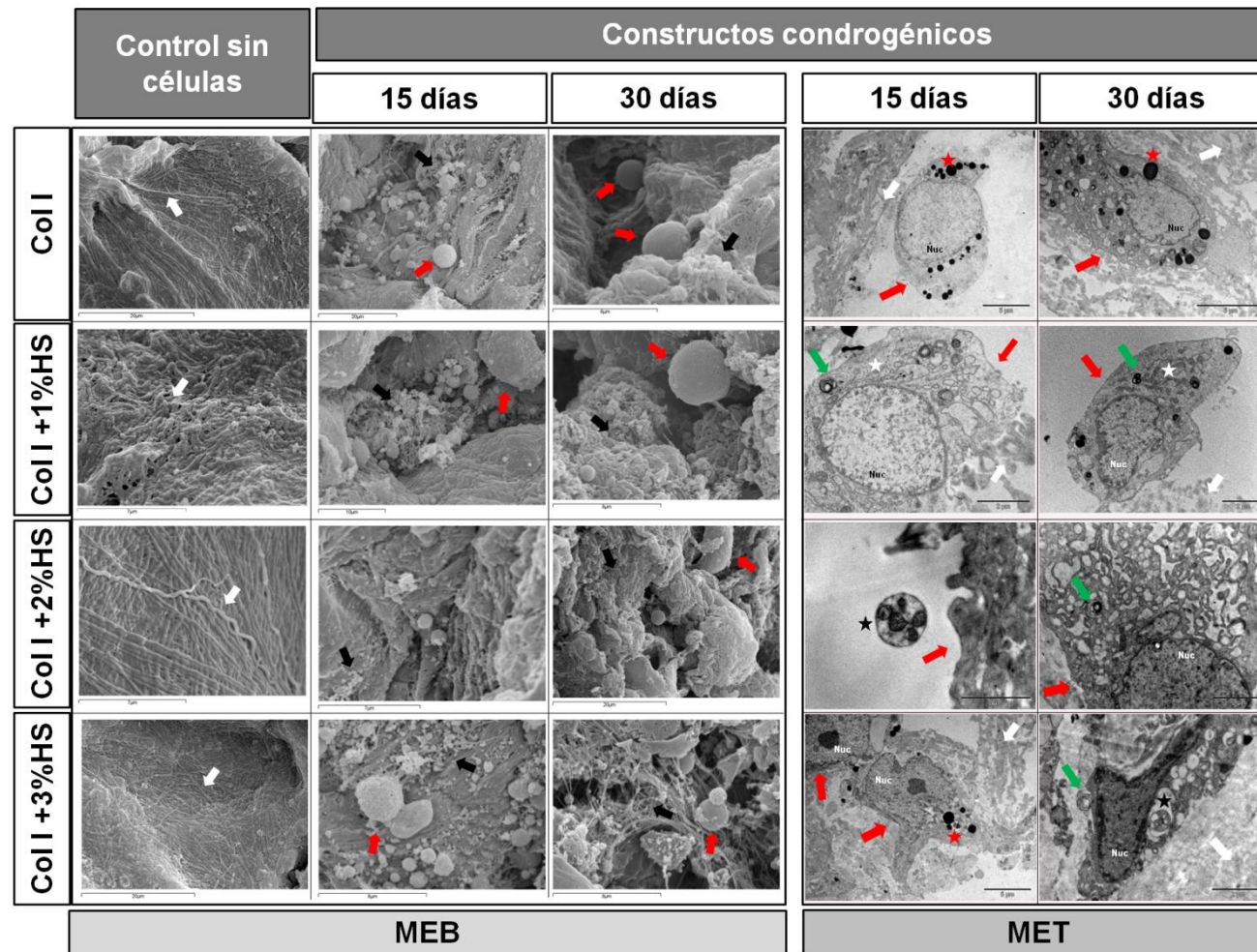
Finalmente, los análisis inmunohistoquímicos para detectar *MMP13* mostraron una disminución de la positividad en controles no diferenciados, entre los 15 y los 30 días, siendo en éste ausente. No se detectó presencia de *MMP13* en los constructos estimulados, salvo en Col I +3%HS a los 15 días pero a los 30 días ya no se detectó (Figuras 32 y 33, Tabla 4 - Anexo III).

#### **4.2.1.3. Análisis morfométrico de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato**

Mediante MEB se analizaron los biomateriales cultivados con células, en medio condrogénico, y sus respectivos controles sin células. Las muestras se estudiaron a los 15 y 30 días de cultivo (Figura 34, MEB).

Tras 15 días, los soportes con CMEs-MO mostraron un alto número de células sobre todo el área de estudio. La morfología celular con frecuencia fue esférica.





**Figura 34.** Estudio morfométrico y ultraestructural de los diferentes constructos condrogénicos, tras 15 y 30 días de cultivo, mediante MEB y MET. ★ : vesículas de secreción; ★ : vesículas electrón-densas; ☆ : retículo endoplasmático rugoso; ➡ : fibras de la MEC; ➡ : células; ➡ : fibras del biomaterial; ➡ : mitocondrias; Nuc: núcleo.



Estas células estaban adheridas a la superficie tanto de los soportes de Col I como a la de los de Col I y HS (Figura 34, MEB; flechas rojas).

Tras 30 días, se incrementó el número de células presentes en los constructos. Éstas se encontraban dispersas sobre las superficies de los soportes y también se pudieron observar dentro de los poros (Figura 34, MEB). Las células también presentaron morfología esférica, por lo que fueron capaces de mantener el fenotipo diferenciado.

Con respecto al ambiente extracelular, tras 15 días en cultivo se detectaron gran cantidad de fibrillas (Figura 34, MEB; flechas negras) y vesículas rodeando, e incluso cubriendo, a las células. Estas vesículas probablemente fueron sintetizadas y liberadas por las células, ya que no se observan en los controles. Esta MEC cubrió una amplia región de los soportes. Tras 30 días, la MEC cubrió casi la totalidad de la superficie analizada del soporte, siendo difícil diferenciar al propio biomaterial (Figura 34, MEB).

#### ***4.2.1.4. Análisis ultraestructural de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y heparán sulfato***

Los análisis de MET se realizaron sólo en biomateriales con CMEs-MO cultivadas en medio condrogénico durante 15 y 30 días. En ambos tiempos de estudio se encontraron células en todos los tipos de biomateriales, con variación en el tamaño desde 10 a 20  $\mu\text{m}$  y mostrando morfología redondeada u ovoide. Los núcleos eran prominentes y mostraron morfología diversa, siendo la mayoría esféricos (Figura 34, MET; Nuc). Dentro de algún núcleo fue posible diferenciar el nucleolo, como un área densa, normalmente localizado en la región central del núcleo. También se observó la heterocromatina dispersa en el núcleo. Se observaron lípidos electrón-densos en el citoplasma de las células (Figura 34, MET; estrellas rojas). También se observaron otras vesículas menos electrón-densas, de material de secreción (Figura 34, MET; estrellas negras) y su número y tamaño aumentó de 15 a 30 días de cultivo. Las áreas extracelulares también mostraron una gran cantidad de vesículas electrón-densas y vesículas liberadas, en la proximidad de la superficie celular. Esto indica la actividad entre las células y la MEC. En algunos casos, el retículo endoplasmático rugoso mostró una gran cantidad de ribosomas y un lumen

aumentado (Figura 34, MET; estrellas blancas), conteniendo una gran cantidad de material de secreción, lo cual indica una gran actividad de biosíntesis. Con respecto a las mitocondrias, se encontraron en gran cantidad con un tamaño y morfología similar, en ambos tiempos de cultivo (Figura 34, MET; flechas verdes).

Tras 15 y 30 días de cultivo, se pudo observar el biomaterial rodeando a las células (Figura 34, MET; flechas blancas).

#### **4.2.2. Evaluación de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos**

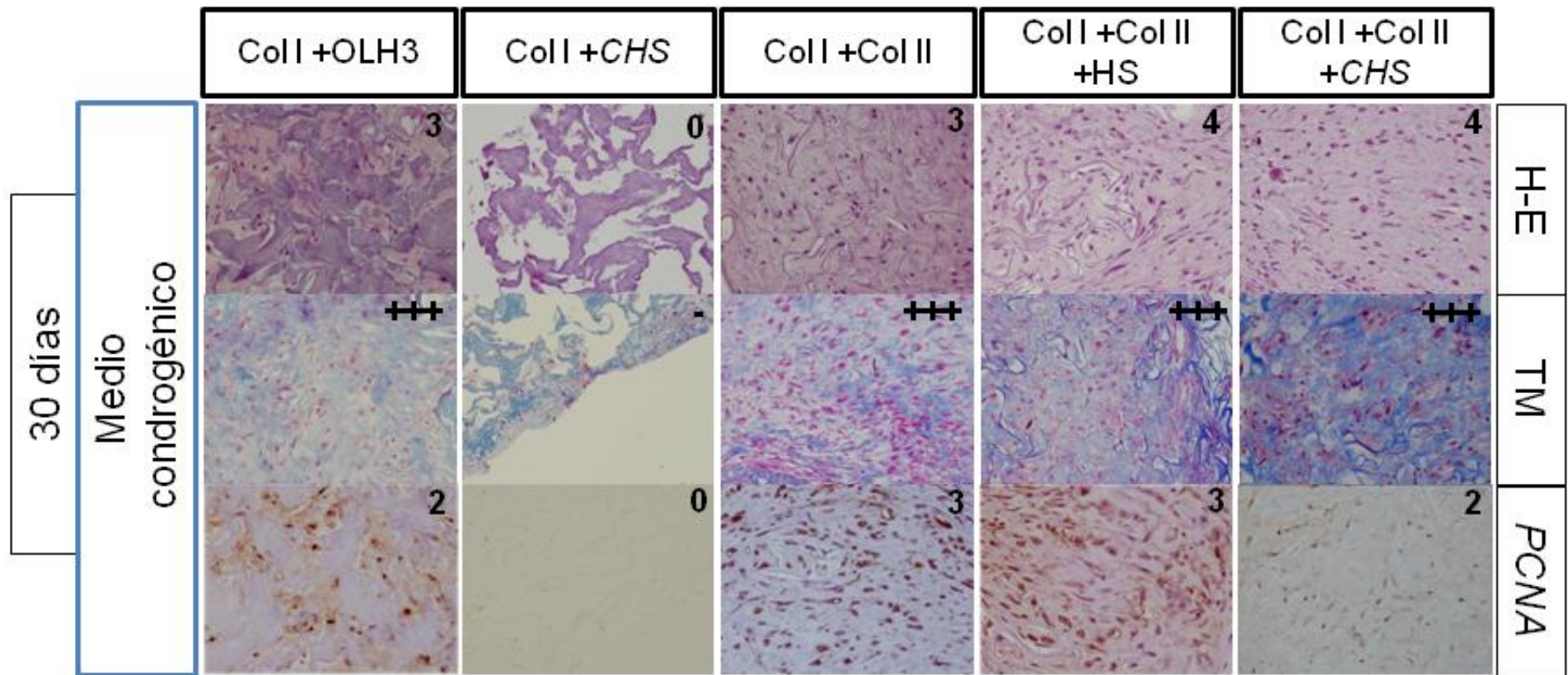
##### **4.2.2.1. Análisis celular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos**

- **Localización, viabilidad y proliferación de las células en los constructos**

Las tinciones con H-E y TM mostraron que el porcentaje de células en el área de biomaterial analizado fue > 50% en Col I +Col II y Col I +OLH3, > 75% en Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS, mientras que en Col I +CHS fue <1% (Figura 35, Tabla 5 - Anexo III). Las CMEs-MO fueron capaces de crecer en la superficie y dentro de los soportes, excepto en Col I +CHS, en donde sólo crecieron en la superficie. En los constructos de Col I +Col II, Col I +Col II +HS, Col I +Col II +CHS y Col I +OLH3, se encontraron agregados celulares con MEC circundante y la subsecuente degradación del biomaterial, siendo el soporte de Col I +OLH3 el menos degradado (Figura 35).

Con la tinción de TM observamos grandes cantidades de Col en la MEC secretadas por las células crecidas en Col I +Col II, Col I +Col II +HS, Col I +Col II +CHS, pero en menor cantidad en Col I +OLH3 (Figura 35, Tabla II - Anexo1). En cuanto a los constructos de Col I +CHS, sólo el soporte mostró positividad para TM (Figura 35).

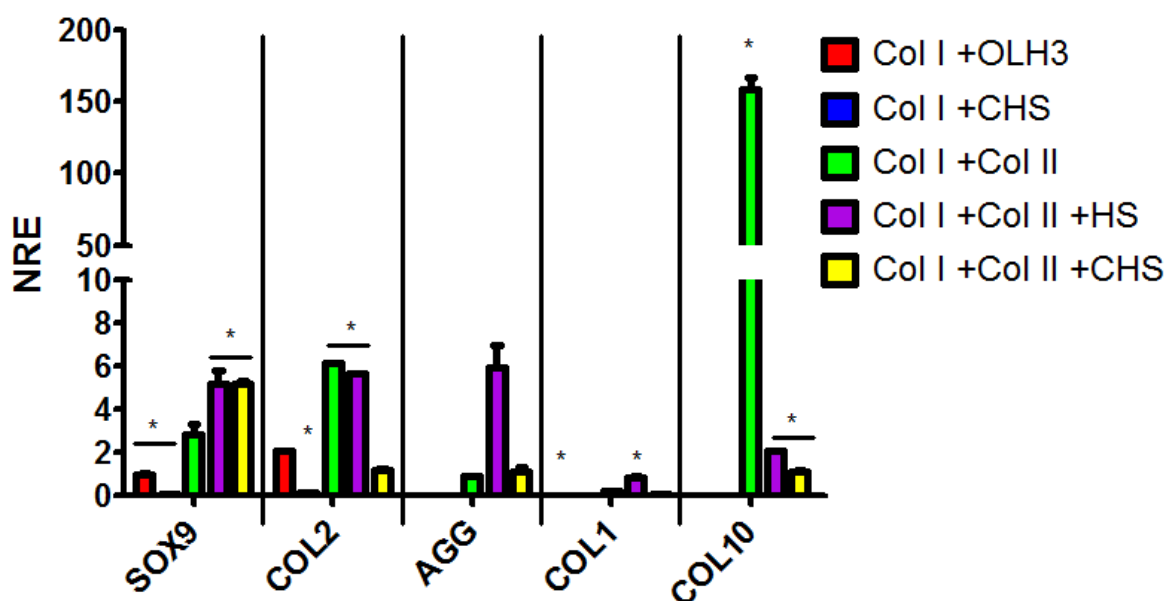
Con la inmunotinción con PCNA se detectó una gran cantidad de células proliferativas, excepto en Col I +CHS (Figura 35, Tabla 5 - Anexo III). Col I +Col II y Col I +Col II +HS mostraron el mayor porcentaje de células en proliferación (Figura 35, Tabla 5 - Anexo III).



**Figura 35.** Imágenes de las tinciones (filas) de H-E, TM e inmunotinciones con *PCNA* de los constructos, cultivados durante 30 días en medio condrogénico. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I +OLH3, Col I +CHS, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS. Aumento 200x.

- **Perfil molecular de las células diferenciadas sobre los constructos**

Entre los diferentes constructos se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes típicos condrocíticos SOX9 ( $p$ -valor=0,03) y COL2 ( $p$ -valor=0,04). Las células que crecieron en los soportes de Col I +CHS expresaron los NRE más bajos para SOX9 ( $0,09 \pm 0,00$ ), mientras que los más altos se obtuvieron en Col I +Col II +HS ( $5,21 \pm 0,61$ ) (Figura 36).



**Figura 36.** NRE de los genes característicos de condrocitos (SOX9, COL2 y AGG) y no característicos (COL1 y COL10) en los constructos condrogénicos, tras 30 días de cultivo. \* Diferencias significativas.

Las células crecidas en Col I +CHS también expresaron los NRE más bajos para COL2 ( $0,15 \pm 0,01$ ), mientras que las células crecidas en Col I +Col II ( $6,13 \pm 0,00$ ) y Col I +Col II +HS ( $5,67 \pm 0,00$ ) mostraron los NRE más altos (Figura 36). Los NRE de AGG más altos se encontraron en los constructos de Col I +Col II +HS ( $5,97 \pm 1,00$ ) y los más bajos en Col I +OLH3 ( $0,00 \pm 0,00$ ) y Col I +CHS ( $0,00 \pm 0,00$ ), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes soportes ( $p$ -valor=0,07) (Figura 36). Sí se encontraron diferencias significativas en la expresión de COL1 ( $p$ -valor=0,02). Los NRE de COL1 más altos se encontraron en Col I +Col II +HS ( $0,80 \pm 0,13$ ) y los más bajos en Col I +OLH3 ( $0,00 \pm 0,00$ ) (Figura 36). También se encontraron diferencias significativas en la expresión de COL10 ( $p$ -valor=0,01), en donde los NRE fueron mayores en Col I +Col II

(162,49  $\pm$  12,36) que en Col I +Col II +HS (2,04  $\pm$  0,07) y Col I +Col II +CHS (1,15  $\pm$  0,15). No se detectó expresión de COL10 en los constructos de Col I +OLH3 y Col I +CHS.

#### **4.2.2.2. Análisis de la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos**

- Estudio de componentes característicos de la matriz extracelular de los condrocitos**

Las fibras de los soportes se tiñeron ortocromáticamente con SO. Los constructos celulares de Col I +Col II y Col I +Col II +HS mostraron la mayor tinción metacromática para SO, indicando la presencia de PGs sulfatados (Figura 37, Tabla 5 - Anexo III). Los constructos de Col I +Col II +CHS y Col I +OLH3 presentaron una metacromasia moderada, mientras que los de Col I +CHS no presentaron tinción (Figura 37, Tabla 5 - Anexo III). Sin embargo, la inmunotinción con *Agg* resultó negativa en todos los constructos (Figura 37) y en los controles sin células (Figura 37, Tabla 5 - Anexo III).

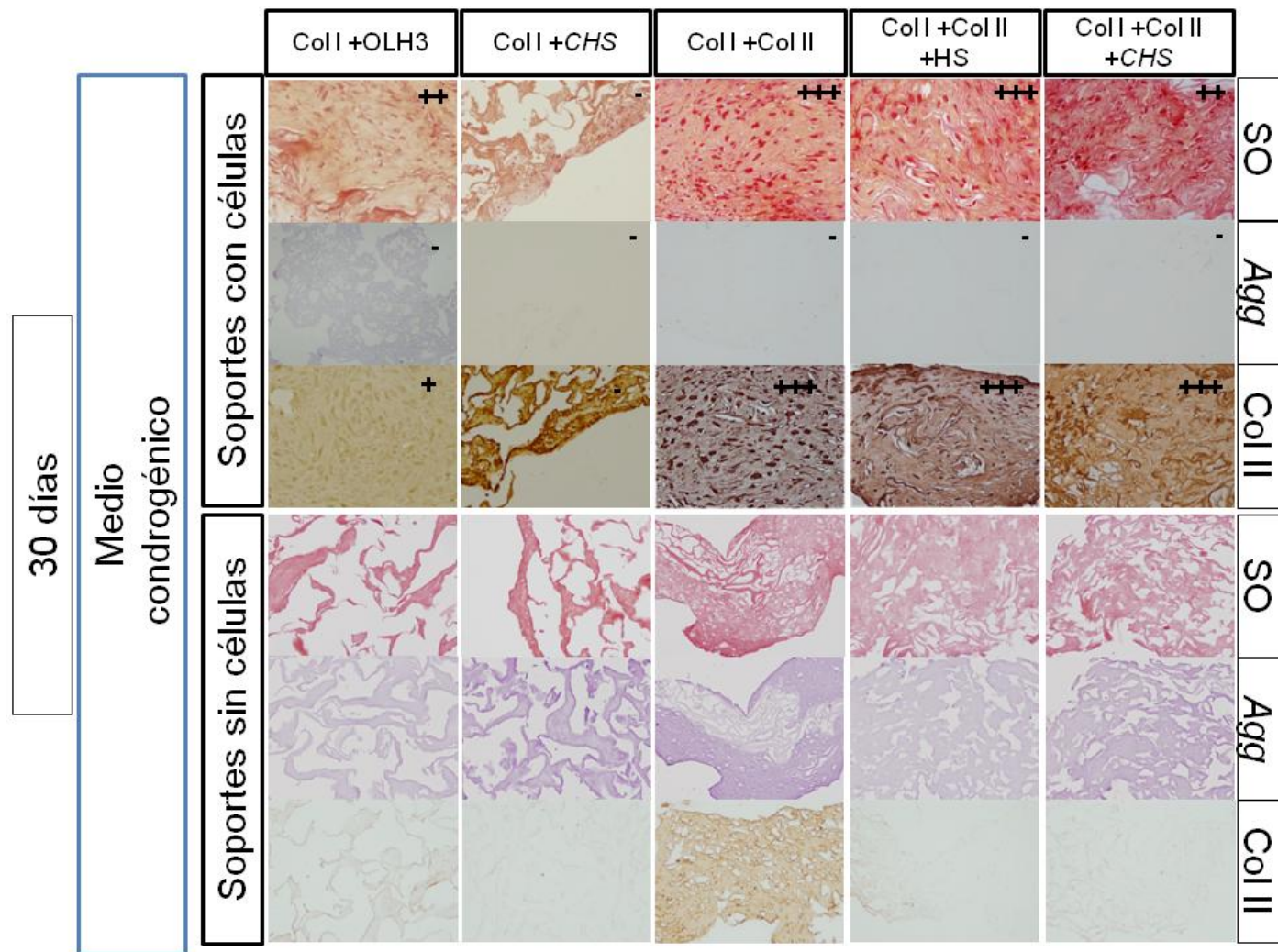
La MEC de todos los constructos resultó positiva para la inmunotinción con Col II, excepto Col I +CHS. Los constructos de Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS resultaron más intensamente teñidos que los de Col I +OLH3 (Figura 37, Tabla 5 - Anexo III).

En los controles sin células se observó tinción débil, con Col II, de las fibras de los soportes, excepto en el biomaterial de Col I +Col II que mostró una tinción mucho mayor (Figura 37).

Para determinar el Col total secretado ( $\mu$ g) por las células, en cada constructo, se tuvo en cuenta la liberación de Col de los diferentes soportes (cultivados en medio condrogénico sin células) a los sobrenadantes.

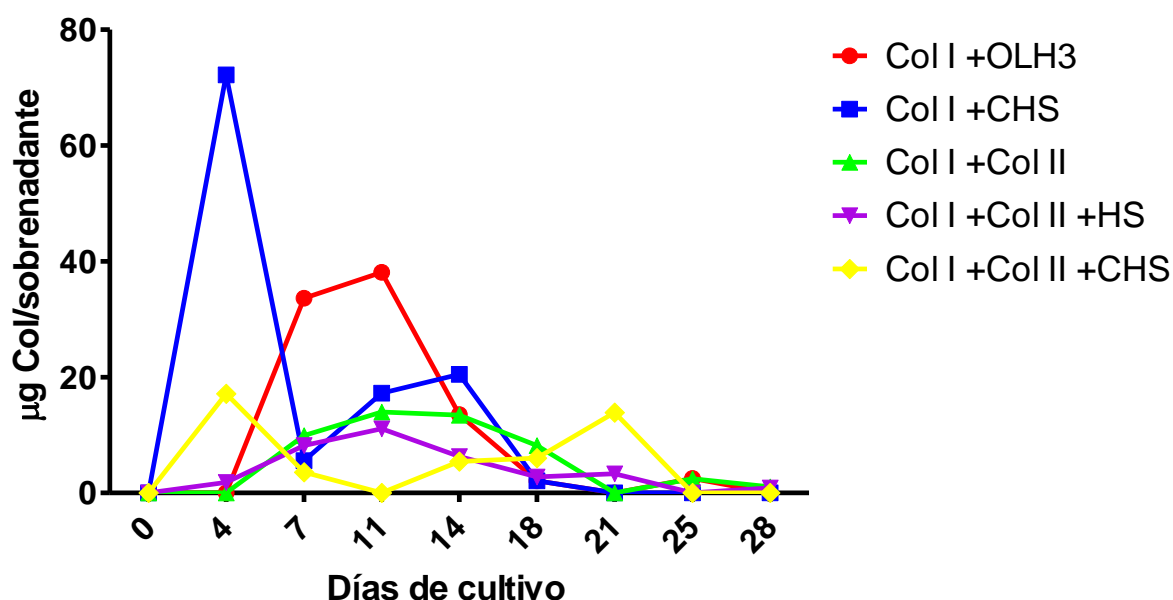
En los constructos de Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +OLH3 las células liberaron Col de forma progresiva hasta un pico máximo y luego decreció progresivamente. A día 11, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +OLH3 presentaron concentraciones de 13,99  $\pm$  4,77  $\mu$ g; 11,10  $\pm$  7,50  $\mu$ g y 38,10  $\pm$  6,13  $\mu$ g, respectivamente (Figura 38).





**Figura 37.** Estudio de componentes característicos de la MEC de condrocitos, en los constructos cultivados durante 30 días en medio condrogénico. Imágenes de la tinción (filas) de SO e inmunotinciones con Agg y Col II. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I +OLH3, Col I +CHS, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS. Aumento 200x.

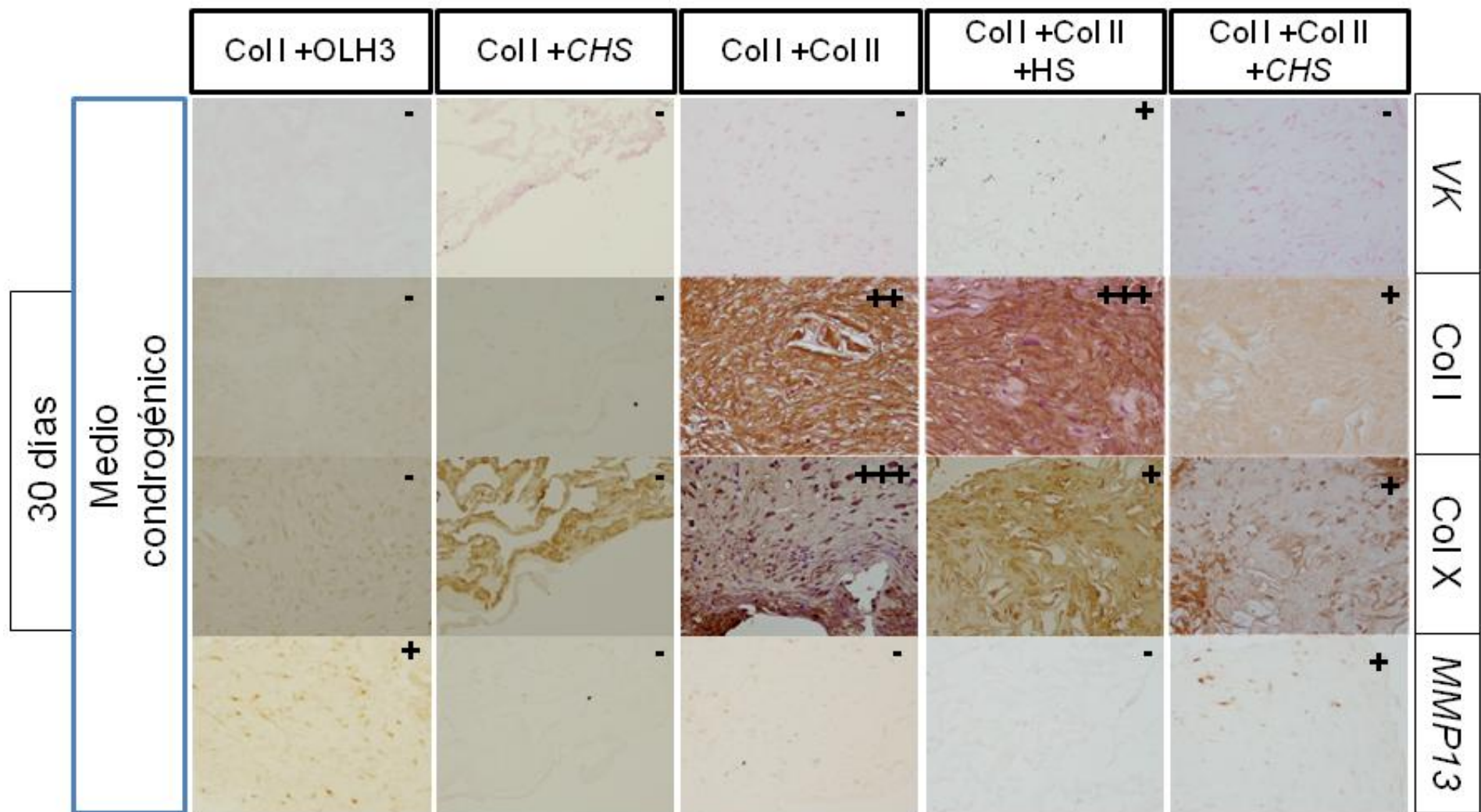
Los sobrenadantes de los constructos de Col I +Col II +*CHS* mostraron dos picos de concentración: uno a día 4 ( $17,16 \pm 12,87 \mu\text{g}$ ) y, tras unos días de concentración más baja, otro a día 21 ( $13,90 \pm 3,93 \mu\text{g}$ ). Col I +*CHS* también mostró dos picos, a día 4 ( $72,22 \pm 11,47 \mu\text{g}$ ) y a día 14 ( $20,50 \pm 3,42 \mu\text{g}$ ) (Figura 38). Se detectaron diferencias significativas en el Col total liberado por los diferentes tipos de constructos, en los días 4 ( $p\text{-valor}=0,00$ ), 11 ( $p\text{-valor}= 0,00$ ), 14 ( $p\text{-valor}= 0,04$ ) y día 21 ( $p\text{-valor}=0,01$ ). Las concentraciones de Col significativamente más altas se encontraron en Col I +*CHS* a días 4 ( $72,22 \pm 11,47 \mu\text{g}$ ) y 14 ( $20,50 \pm 3,42 \mu\text{g}$ ), a día 11 en Col I +OLH3 ( $38,10 \pm 6,13 \mu\text{g}$ ) y a día 21 en Col I +Col II +*CHS* ( $13,90 \pm 3,94 \mu\text{g}$ ) (Figura 38).



**Figura 38.** Gráfico de la liberación de Col ( $\mu\text{g}$ ) a los sobrenadantes de los cultivos de los diferentes constructos, entre los días 0-28 de cultivo, en medio condrogénico.

- **Estudio de otros componentes de la matriz extracelular**

Ningún constructo mostró positividad para la tinción con VK, excepto Col I +Col II +HS, el cual mostró una ligera positividad, lo cual indica que no hubo mineralización en los constructos (Figura 39, Tabla 5 - Anexo III).



**Figura 39.** Estudio de otros componentes en la MEC de los constructos cultivados durante 30 días, en medio condrogénico. Imágenes de la tinción (filas) de VK e inmunotinciones con Col I, Col X y MMP13. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I +OLH3, Col I +CHS, Col I +Col II, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS. Aumento 200x.



La inmunohistoquímica reveló que las MEC de los constructos de Col I +Col II y Col I +Col II +HS y las células en Col I +Col II +CHS, presentaron positividad para Col I (Figura 39, Tabla 5 - Anexo III). Las células crecidas en Col I +OLH3 y los constructos de Col I +CHS no mostraron positividad (Figura 39, Tabla 5 - Anexo III).

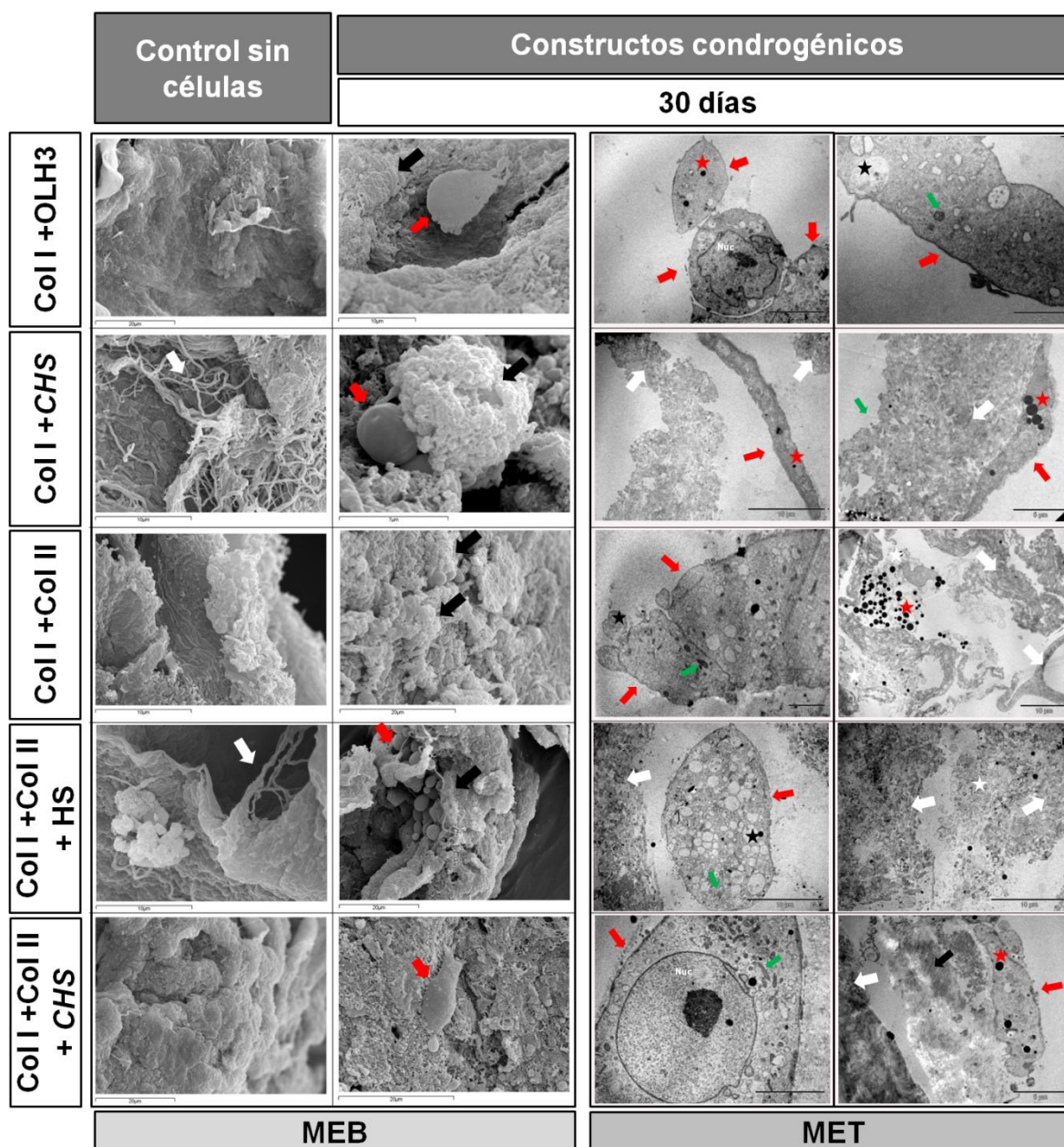
En los constructos de Col I +Col II tanto las células como la MEC se tiñeron fuertemente con Col X, mientras que la MEC de los constructos de Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS se tiñó débilmente (Figura 39, Tabla 5 - Anexo III). Las células de los constructos de Col I +OLH3 y de Col I +CHS no presentaron positividad para la inmunotinción con Col X (Figura 39, Tabla 5 - Anexo III).

Las células crecidas en los constructos no mostraron positividad para la inmunotinción para *MMP13*, excepto en Col I +Col II +CHS y en Col I +OLH3 en las que se observó una positividad intracitoplasmática débil (Figura 39, Tabla 5 - Anexo III).

#### **4.2.2.3. Análisis morfométrico de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos**

Los análisis morfométricos en los constructos condrogénicos se llevaron a cabo mediante MEB. La morfología fue variable en las células presentes en todos los biomateriales, desde aplanadas hasta ovalado/redondeadas (Figura 40, MEB; flechas rojas) con prolongaciones de la pared celular, en algunos casos de largo tamaño.

En el espacio extracelular de todos los constructos, se encontraron acumulaciones de material fusionado (Figura 40, MEB) y esférico en las proximidades de las células que no aparecen en los respectivos controles sin células (Figura 40, MEB; flechas negras). Estas acumulaciones eran electrón-densas por lo que indica una alta afinidad al  $\text{OsO}_4$  y, por tanto, alto contenido lipídico. Estas acumulaciones también estaban presentes en MET (Figura 40; estrellas rojas). Esto puede indicar que se trata de vesículas de material extracelular activamente secretado por las células.



**Figura 40.** Estudio morfométrico y ultraestructural de los constructos condrogénicos, tras 30 días de cultivo, mediante MEB y MET. ☆: células apoptóticas; ★: vesículas de secreción; ★: vesículas electrón-densas; ■: MEC; □: fibras del biomaterial; →: células; →: mitocondrias; Nuc: núcleo.

#### 4.2.2.4. Análisis ultraestructural de las células y la matriz extracelular de los constructos condrogénicos de colágeno y glicosaminoglicanos

El análisis ultraestructural de los constructos utilizando MET, mostró células en todos los soportes (Figura 40, MET; flechas rojas) y se observaron algunas zonas de los biomateriales que estaban degradadas. En algunos casos las células se encontraban en proliferación. La morfología celular era aplanada y/o

redondo/ovalada en los constructos, pero en Col I +*CHS* además se detectaron células con morfología fibroblástica (Figura 40, MET). Las células mostraron abundantes orgánulos intracelulares como mitocondrias (Figura 40, MET; flechas verdes), indicando una alta actividad celular. Se observaron prolongaciones alrededor de las células (Figura 40, MET) y dentro de las células se encontraron gránulos electrón-densos (Figura 40, MET; estrellas rojas). Dentro de los biomateriales, se han detectado células vacuolizadas apoptóticas y restos celulares (Figura 40, MET; estrellas blancas).

Dentro de los constructos de Col I +Col II, las células se encontraban entre fibras del biomaterial (Figura 40, MET) y la MEC no se detectó. Las células en los constructos de Col I +Col II +HS se encontraban rodeadas de biomaterial, aunque tampoco se detectó MEC. Al igual que en Col I +Col II, se encontraron abundantes secreciones en Col I +Col II +HS (Figura 40, MET), vesículas intracitoplasmáticas electrón-densas (Figura 40, MET) y pequeñas prolongaciones (Figura 40, MET). En estas células, se encontraron menos mitocondrias y las vacuolas eran más patentes (Figura 40, MET). Dentro de los constructos de Col I +Col II +*CHS*, las células se encontraron adheridas a las fibras del biomaterial (Figura 40, MET). Estas células mostraron forma irregular y mucha MEC, en la que se pudo observar fibras de Col formando haces en diferentes planos (Figura 40, MET; flecha negra). Las células contenían muchos gránulos electrón-densos y orgánulos (Figura 40, MET), particularmente mitocondrias. El núcleo celular presentaba morfología oval/redondeada con nucleolo prominente (Figura 40, MET; Nuc). No se encontraron prolongaciones aparentes alrededor de las células, sólo una pequeña cantidad de material extracelular (Figura 40, MET).

Los constructos de Col I +OLH3 tenían células de diferentes morfologías, desde alargadas a redondeadas (Figura 40, MET) pero no se encontró MEC. Estas células no presentaban biomaterial a su alrededor. En el citoplasma se encontraban muchas vesículas de secreción (Figura 40, MET) y gránulos electrón-densos. Estas células poseían muchas prolongaciones y no se detectó material extruido.

Dentro de los constructos de Col I +CHS se encontraron células apoptóticas. Además, se detectaron células de más de 20µm de largo, con morfología fibroblástica que estaban unidas al soporte (Figura 40, MET). Estas células contenían un gran número de gránulos electrón-densos en el citoplasma (Figura 40, MET) y no se encontró ni material extruido ni MEC.

### 4.3. Evaluación de los constructos osteogénicos ovinos

#### 4.3.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los constructos osteogénicos de colágeno y los de $\beta$ fosfato tricálcico

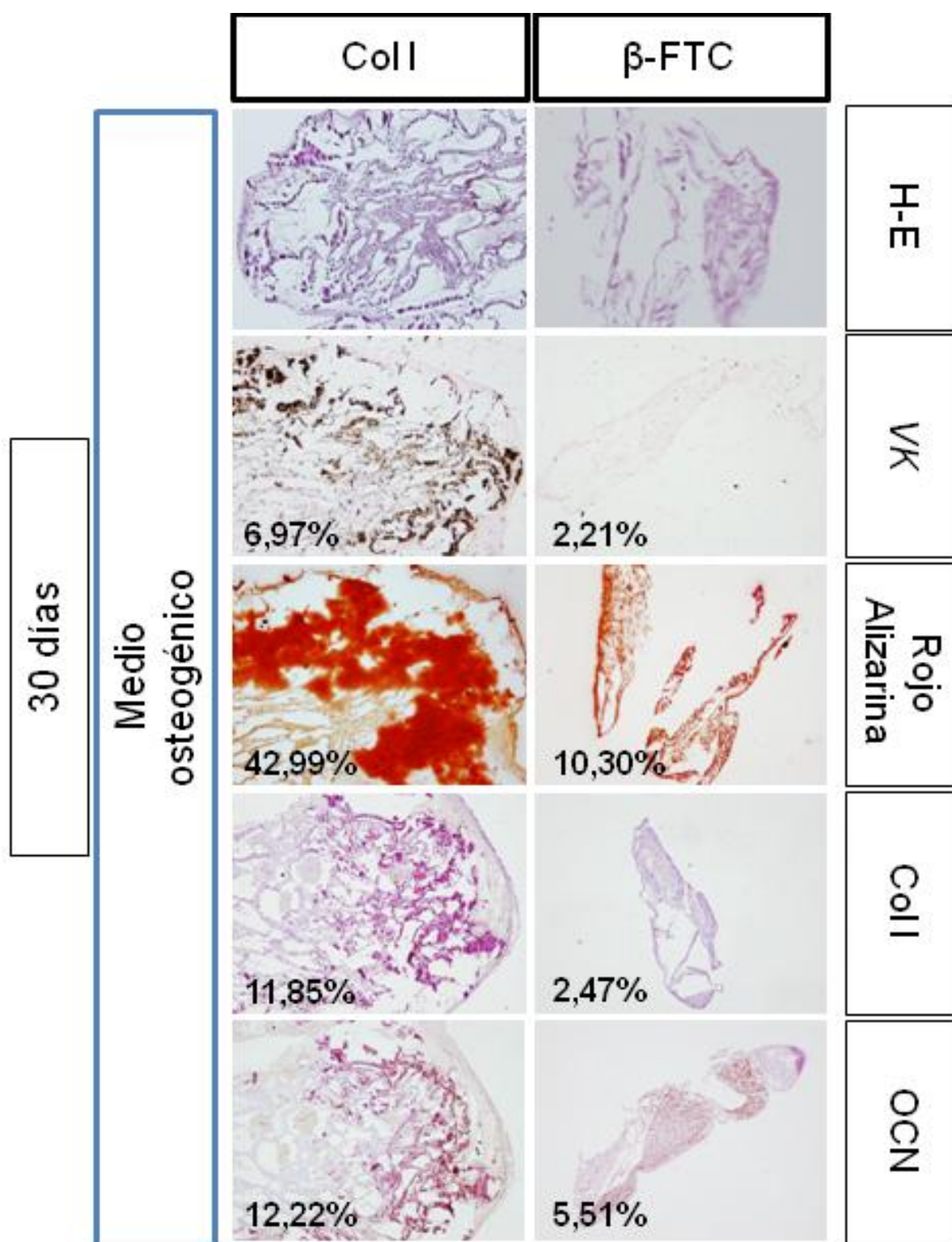
La tinción con H-E de los constructos osteogénicos revelaron una baja celularidad y escasa MEC en ambos tipos de soportes, Col I y  $\beta$ -FTC. En las esponjas de Col I se encontraron células de morfología cúbica, similar a la de los osteoblastos (Figura 41).

La tinción con Rojo Alizarina y VK fue significativamente mayor en los biomateriales de Col I que en los de  $\beta$ -FTC ( $42,99 \pm 2,25\%$  y  $10,30 \pm 0,24\%$ , respectivamente para Rojo Alizarina,  $p$ -valor=0,01; y  $6,97 \pm 1,31\%$  y  $2,21 \pm 0,93\%$ , respectivamente para VK,  $p$ -valor= 0,02) (Figura 41).

Las inmunotinciones para Col I y OCN revelaron mayor positividad para ambas proteínas en las esponjas de Col I que en los soportes de  $\beta$ -FTC ( $11,85 \pm 1,07\%$  y  $2,47 \pm 0,61\%$ , respectivamente para la inmunotinción de Col I,  $p$ -valor=0,00; y  $12,22 \pm 1,46\%$  y  $5,51 \pm 0,51\%$ , respectivamente para la inmunotinción con OCN,  $p$ -valor=0,00) (Figura 41).

#### 4.3.2. Análisis morfométrico de las células y la matriz extracelular de los constructos osteogénicos de colágeno y los de $\beta$ fosfato tricálcico

La MEB mostró la estructura general de los soportes cultivados sin células: las esponjas de Col I fibriladas muy porosas (Figura 42) y las cerámicas de  $\beta$ -FTC poco porosas.



**Figura 41.** Estudio de la diferenciación osteogénica de las oCMEs-MO sobre los soportes, tras 30 días de cultivo. Imágenes de la tinción (filas) de H-E, VK y Rojo Alizarina e inmunotinciones con Col I y OCN. En las columnas se muestran los diferentes soportes: Col I y  $\beta$ -FTC. Aumento 100x.

Las células se adhirieron y crecieron sólo en la superficie, pero no en el interior de los soportes de  $\beta$ -FTC debido a la falta de microporosidad. Sin embargo, la

estructura fibrilada de la esponja de Col I (Figura 42, MET; flechas blancas) permitió el crecimiento celular por todo el biomaterial. En los constructos de Col I, las células mostraron diferentes morfologías, desde aplanadas hasta redondo/ovaladas, mientras que en los constructos de  $\beta$ -FTC sólo se encontraron células aplanadas (Figura 42, MEB; flechas rojas). Las células mostraron pequeñas prolongaciones cuando se cultivaron en ambos tipos de soportes. Además, se observó presencia de MEC en los constructos de Col I y de  $\beta$ -FTC (Figura 42, MEB; flechas negras).

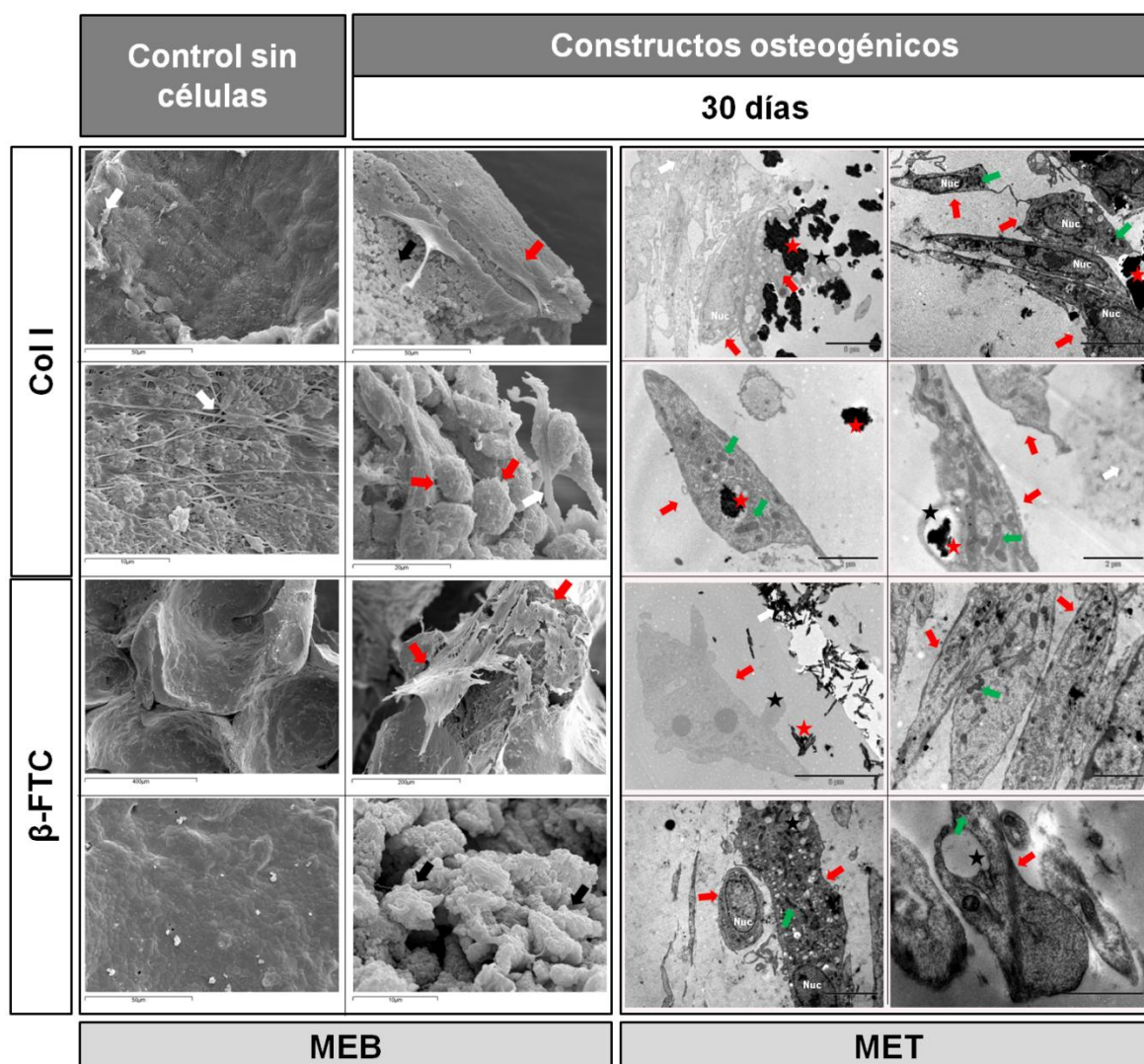
#### **4.3.3. Análisis ultraestructural de las células y la matriz extracelular de los constructos osteogénicos de colágeno y los de $\beta$ fosfato tricálcico**

Los constructos de Col I, analizados mediante MET, mostraron células rodeando precipitados. Las células mostraron morfologías diferentes (Figura 42, MET; flechas y estrellas rojas): redondeada, ovalada, estrellada y aplanada. Estas células, además, se disponían en agregados. En estos agregados se pudieron observar células en contacto mediante pequeñas prolongaciones. En esas zonas de contacto, también se observó un incremento en el número de vacuolas intercelulares. Además, se detectó una gran cantidad de precipitados cálcicos, no sólo en el citoplasma de las células si no en el espacio extracelular (Figura 42, MET; estrellas rojas). En el citoplasma celular se encontraron estos precipitados dentro de vacuolas, para su posible excreción posterior. Ocasionalmente, estas vacuolas de secreción (Figura 42, MET; estrellas negras) se encontraban vacías debido, posiblemente, a que el precipitado ya había sido secretado. En general, las células mostraron una gran cantidad de orgánulos como retículo endoplasmático rugoso con ribosomas, mitocondrias (Figura 42, MET; flechas verdes) y núcleo eucromático (Figura 42, MET, Nuc). Además, en el citoplasma de las células diferenciadas, se observó la acumulación de múltiples vesículas.

El análisis ultraestructural de las cerámicas de  $\beta$ -FTC mostró células con morfología aplanada y pequeñas prolongaciones, rodeadas de precipitados. Los precipitados sólo se observaron en el espacio extracelular (Figura 42, MET; estrellas rojas), por lo que no se pueden distinguir si los precipitados provienen de las células o si son propios del biomaterial. Aunque, en el citoplasma celular



se pudieron observar múltiples vacuolas vacías que inicialmente podían contener este tipo de depósitos (Figura 42, MET; estrellas negras).



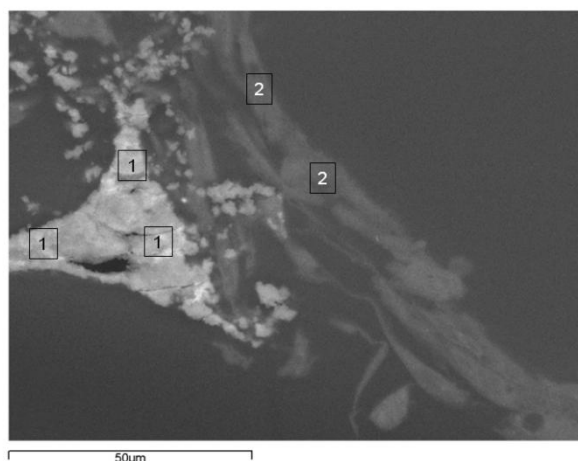
**Figura 42.** Estudio morfométrico y ultraestructural de los diferentes constructos osteogénicos, tras 30 días de cultivo, mediante MEB y MET.  $\Rightarrow$ : biomaterial;  $\rightarrow$ : células;  $\rightarrow$ : mitocondrias;  $\star$ : precipitados;  $\star$ : vesículas de secreción; Nuc: núcleo.

Estas células formaron agregados y mostraron acumulaciones de material electrón-denso en el citoplasma (Figura 42). Estas acumulaciones fueron más abundantes en los constructos de  $\beta$ -FTC que en los de Col I. En general, las células mostraron gran cantidad de orgánulos, múltiples vesículas y un núcleo eucromático (Figura 42, MET: Nuc).

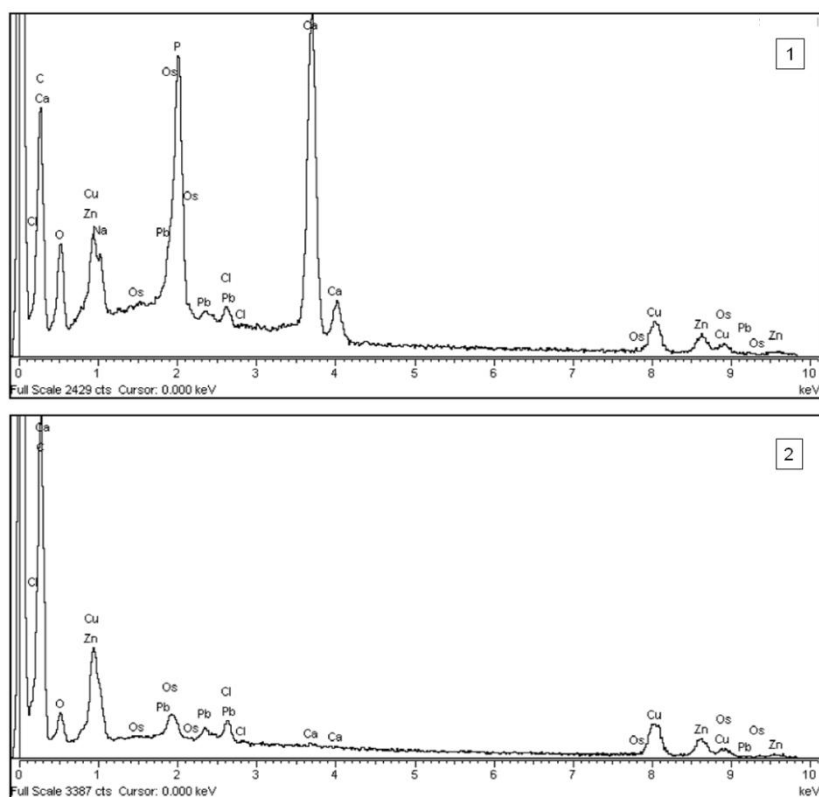
#### 4.3.4. Estudio de los constructos osteogénicos de colágeno I mediante energía dispersiva de rayos x

Para poder verificar que los depósitos encontrados, en el espacio extracelular y en el citoplasma de las células de los constructos de Col I, eran de fosfato cálcico se testaron con EDX (Figura 43).

A)



B)



**Figura 43.** Estudio mediante EDX de los constructos osteogénicos de Col I, cultivados durante 30 días. A) Imagen de MEB de la zona analizada posteriormente con EDX, en la que se observa una zona de precipitado (1) y una zona de células (2). B) Espectros obtenidos del análisis con EDX de la zona de precipitado (1) y de la zona de células (2).



Los análisis se realizaron en diferentes puntos de la muestra para saber la composición exacta. Estos puntos incluían una región de precipitado (Figura 43 A, marcado con el número “1”) y una región de células (Figura 43 A, marcado con el número “2”). Como se puede ver en la Figura 43 B (1), los principales elementos encontrados en el precipitado eran C ( $47,95 \pm 4,93\%$ ) y O<sub>2</sub> ( $18,77 \pm 2,86\%$ ), seguidos de Ca ( $11,87 \pm 0,41\%$ ) y P ( $6,51 \pm 0,19\%$ ). Sin embargo, estos dos últimos elementos, Ca y P, no se detectaron en la región de células (Figura 43 B, 2), en la que sólo se encontró C ( $69,72 \pm 0,95\%$ ) y O<sub>2</sub> ( $9,08 \pm 1,02\%$ ), seguido de Cu ( $10,11 \pm 0,56\%$ ) y Zn ( $6,41 \pm 0,11\%$ ).

Los análisis de EDX no se realizaron en los constructos de  $\beta$ -FTC debido a la imposibilidad de distinguir entre los depósitos secretados por las células y los propios de la cerámica.

#### **4.4. Evaluación de la reparación en los modelos de lesión**

##### **4.4.1. Análisis histológico e inmunohistoquímico del modelo de reparación *in vitro* de cartílago articular humano**

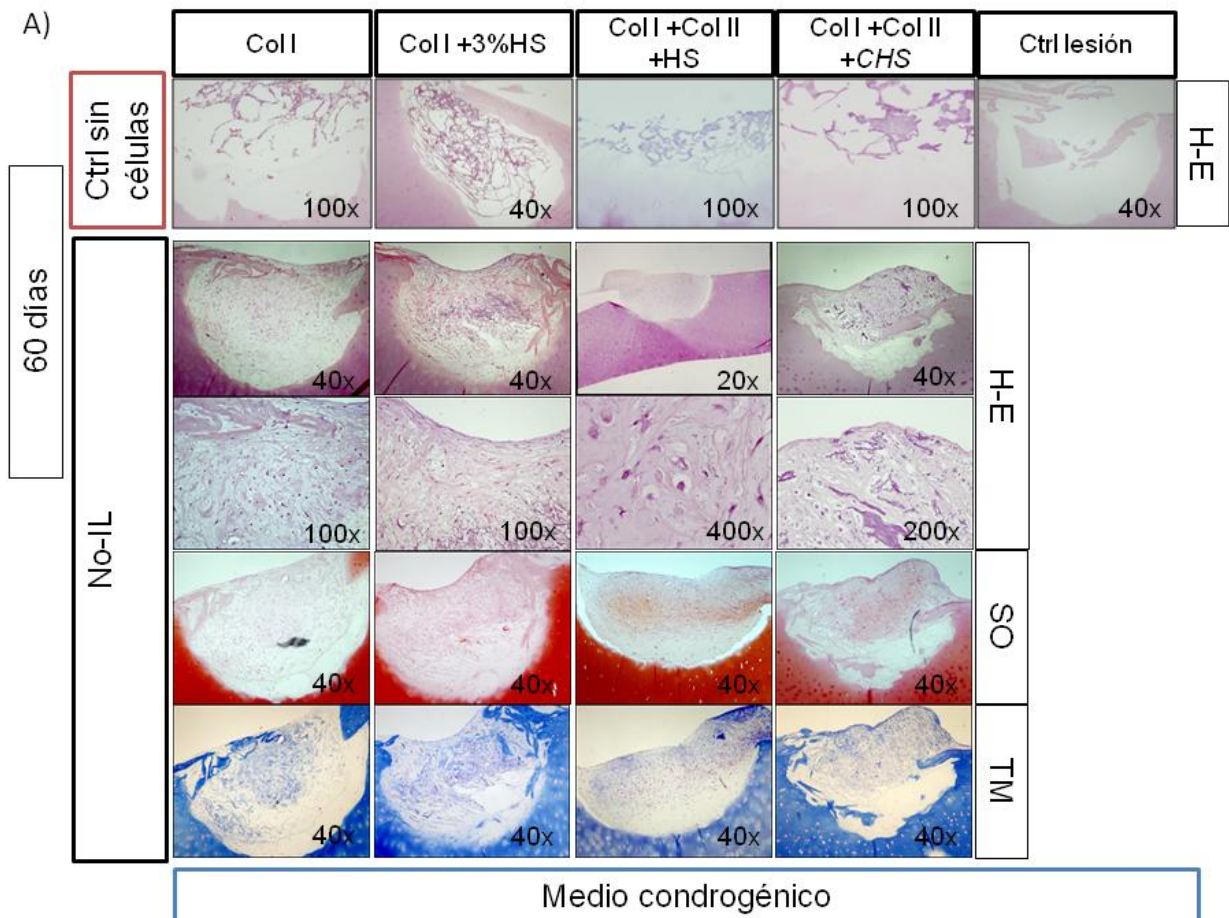
En primer lugar se realizó una valoración con H-E de los dos tipos de modelos: No-IL (Figura 44) e IL (Figura 45).

Utilizando los diferentes tipos de soportes, tanto en los modelos No-IL como en los IL, la tinción con H-E permitió observar la formación de neot Tejido dentro de la lesión y la morfología celular (Figuras 44 A y 45 A).

En los controles sin células sólo se observaron los diferentes biomateriales sin degradar, dentro de las lesiones, y en el control de lesión se observó el hueco de la lesión y esquirlas de cartílago generadas en la manipulación (Figura 44 A).

El primer parámetro analizado de la escala *ICRS II* modificada, fue la morfología tisular, en la que se analiza el Col presente en la MEC del neot Tejido. En la tinción con TM, se observó en el modelo No-IL mayor presencia de Col en la MEC de Col I +Col II +HS (valor 50%) y, en los demás soportes, entre un

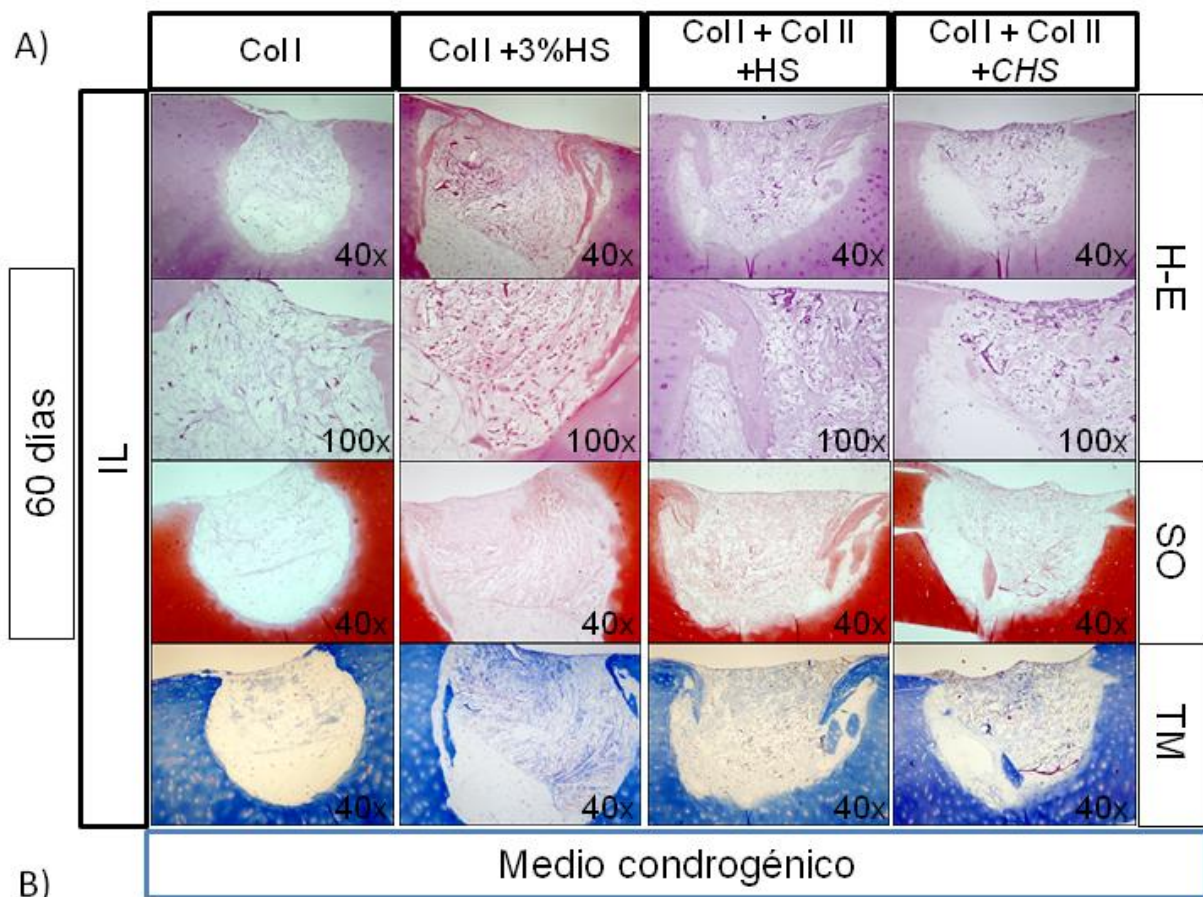
30-35% (Figura 44). En el modelo de IL, la presencia de Col en la MEC fue menor, siendo el Col I +3%HS el que mayor valor presentó (30%) (Figura 45).



B)

Parámetro	Col I	Col I +3%HS	Col I +Col II +HS	Col I +Col II +CHS
Morfología tisular	30	35	50	35
Tinción de la matriz	0	5	50	15
Morfología celular	15	5	70	80
Grupos isogénicos	100	100	100	100
Arquitectura superficial	90	80	90	40
Integración	30	60	80	10
Calificación general	44%	47%	73%	46%

**Figura 44.** Valoración de la reparación en el modelo de lesión No-IL en cartílago humano, en el que se introdujeron constructos de Col I, Col I +3%HS, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS y que se cultivaron durante 60 días en medio condrogénico. A) Imágenes de las tinciones histológicas H-E, SO y TM del modelo y sus controles (Ctrl). B) Valoración obtenida por el modelo en la escala *ICRS II* modificada.



Parámetro	Col I	Col I +3%HS	Col I +Col II +HS	Col I +Col II +CHS
Morfología tisular	5	30	20	20
Tinción de la matriz	0	0	5	0
Morfología celular	0	25	40	40
Grupos isogénicos	100	100	100	100
Arquitectura superficial	80	90	90	50
Integración	5	50	65	50
Calificación general	31%	49%	53%	43%

**Figura 45.** Valoración de la reparación en el modelo de lesión IL en cartílago humano, en el que se introdujeron constructos de Col I, Col I +3%HS, Col I +Col II+ HS y Col I +Col II +CHS y que se cultivaron durante 60 días en medio condrogénico. A) Imágenes de las tinciones histológicas H-E, SO y TM del modelo. B) Valoración obtenida por el modelo en la escala *ICRS II* modificada.

El segundo criterio a evaluar ha sido la tinción de la matriz mediante SO, para determinar el contenido de PGs en la MEC. Los resultados en el modelo de No-IL fueron desde 0% en Col I hasta 50% en Col I +Col II +HS (Figura 44) y  $\leq 5\%$  en los neotejidos del modelo de IL (Figura 45).

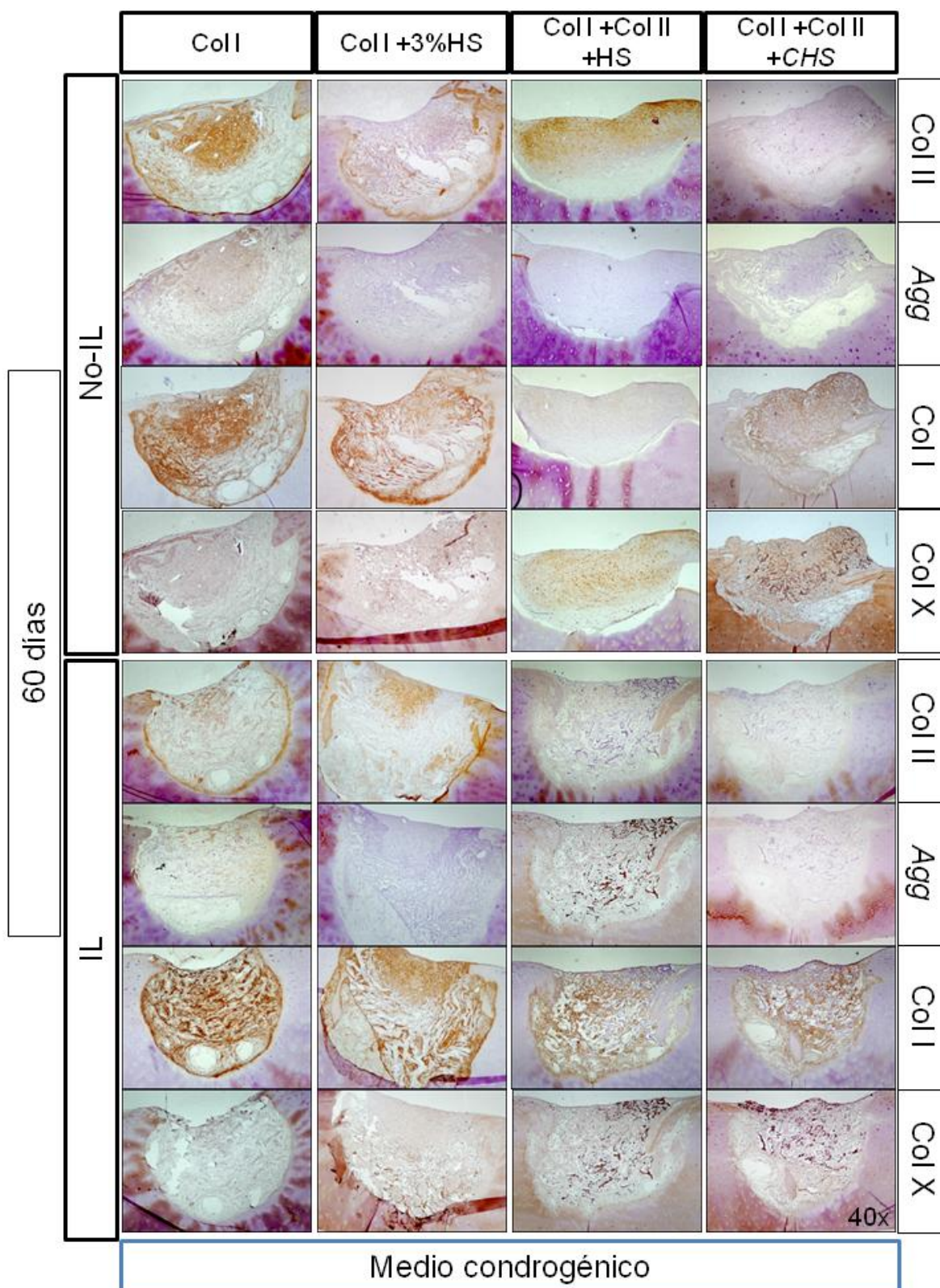
Las dos siguientes variables, la morfología celular y la presencia de grupos isogénicos, se analizaron mediante tinción con H-E (Figura 44 A). Se encontró que en el modelo de No-IL aproximadamente el 5% de las células presentes en Col I +3%HS eran redondeadas y el 15% en Col I, mientras que en Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS se observaron entre 70-80% de células con morfología condrocítica. En el modelo de IL, el 40% fue el máximo valor encontrado, en Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS, para esta variable. En ninguna de las réplicas de los dos modelos se observaron grupos isogénicos en el neotejido, por lo que el valor asignado en todos los casos fue del 100% (Figura 44 B y Figura 45 B).

El siguiente criterio a analizar ha sido la arquitectura de la superficie. En ambos modelos, Col I +Col II +CHS obtuvo el valor más bajo. En las demás reparaciones se asignaron valores altos (80-90%) para este parámetro, debido a que la superficie era lisa y sin interrupciones (Figura 44 y Figura 45).

El último ítem analizado fue la integración con el cartílago nativo, cuyos resultados en el modelo de No-IL fueron 10% en Col I +Col II +CHS, 30% en Col I, 60% en Col I +3%HS y 80% en Col I +Col II +HS (Figura 44). En el modelo de IL, se observó un 5% de integración en Col I, un 50% de integración en Col I +3%HS y Col I +Col II +CHS y un 65% en Col I +Col II +HS.

Finalmente, la calificación general se realizó como la media de los valores asignados a los seis parámetros anteriormente analizados. La peor reparación obtenida ha sido con los constructos de Col I, en el modelo de IL, que alcanzó un valor del 31% indicando la presencia de un tejido fibroso (Figura 45 B); y la mejor reparación ha sido con los constructos de Col I +Col II +HS en el modelo de No-IL, con un valor del 73%, lo que indica la formación de un neotejido intermedio entre fibrocartílago y cartílago hialino (Figura 44 B). En el resto de neotejidos se obtuvieron valores entre el 43-53%, lo que en esta escala es indicativo de fibrocartílago.





**Figura 46.** Imágenes de las tinciones inmunohistoquímicas de Col II, Agg, Col I y Col X de los modelos No-IL e IL, tras 60 días de cultivo en medio condrogénico.

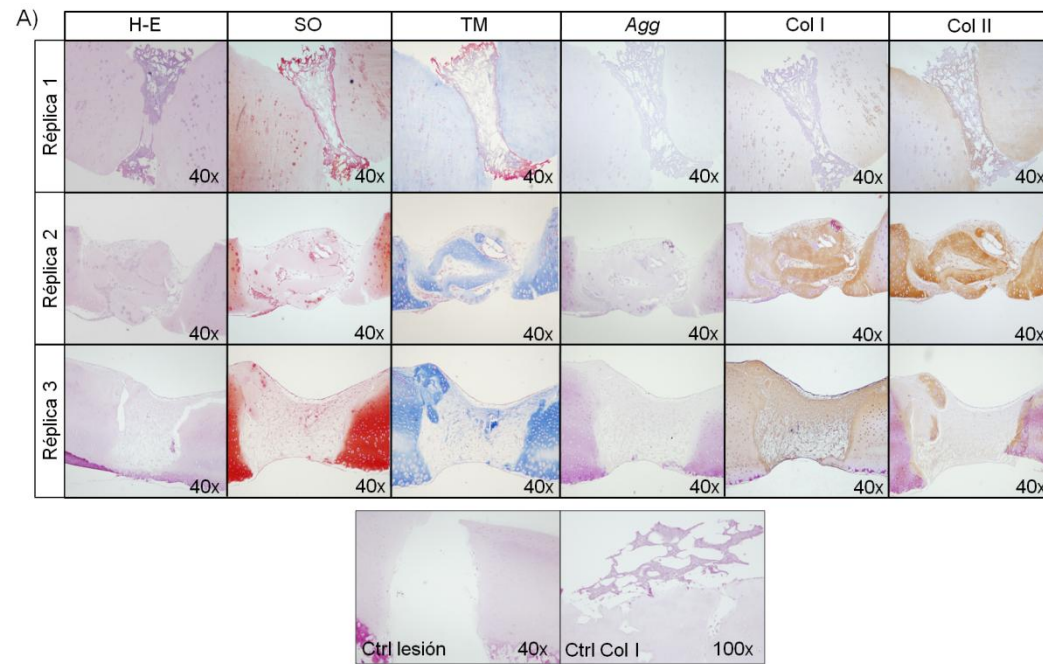
Además, los neotejidos formados en los modelos de No-IL e IL, se han inmunoteñido para Col I, Col II, Col X y *Agg* (Figura 46). Se observó la presencia de Col II en la MEC de todos los neotejidos, excepto en Col I +Col II +*CHS* (No-IL e IL) y Col I +Col II +HS IL, presentando este último la tinción más fuerte en la condición de No-IL (Figura 46). En cuanto al *Agg*, no se detectó en la MEC de los tejidos salvo en Col I (No-IL e IL) y en Col I +Col II +HS IL. Por otro lado, la presencia de Col I en la MEC fue evidente en todas las réplicas, aunque mayor en los soportes de Col I (No-IL e IL), excepto en Col I +Col II +HS No-IL. Finalmente, el Col X se observó en todos los neotejidos formados e incluso en el cartílago nativo, en ambos modelos (Figura 46).

#### **4.4.2. Análisis histológico e inmunohistoquímico del modelo de reparación *in vitro* de cartílago articular ovino**

Aún cuando el objetivo principal del modelo era realizar lesiones semicirculares en la superficie del cartílago, se generaron lesiones más profundas (de lado a lado) (Figura 47 A). Esto fue debido a la delgadez del cartílago ovino. En los cortes histológicos se observaron astillas del cartílago nativo, dentro de las lesiones, producidas debido a la manipulación en el proceso de la generación de la lesión.

La tinción con H-E permitió observar la formación de neotejido dentro de la lesión (Figura 47 A, intermedia y mejor). El biomaterial de Col I apenas se había degradado en la peor réplica, mientras que en la mejor se encontraba totalmente degradado (Figura 47 A). En el control sin células se pudo observar el biomaterial sin degradar y, en el control de lesión se observó el hueco de la lesión (Figura 47 A).

El primer parámetro analizado de la escala *ICRS II* modificada fue la morfología tisular, utilizando la tinción de TM. La réplica 1 no mostró MEC por lo que el valor otorgado fue 0%. En la réplica 2 se observó MEC con fibras de Col heterogéneas (valor 25%). En réplica 3 se observaron fibras de Col en el neotejido, más evidentes en la zona profunda de la lesión que en la zona superficial (valor 60%) (Figura 47 A y B).



B)

Escala *ICRS II* modificada

Parámetro	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Morfología tisular	0%	25%	60%
Tinción de la matriz	0%	15%	35%
Morfología celular	10%	50%	55%
Grupos isogénicos	100%	100%	100%
Arquitectura superficial	5%	50%	80%
Integración	0%	75%	90%
Calificación general	19%	52%	70%

**Figura 47.** Valoración de la reparación en el modelo de lesión en cartílago ovino, en el que se introdujeron constructos de Col I y que se cultivaron durante 60 días en medio condrogénico. A) Imágenes de las tinciones histológicas (H-E, SO y TM) e inmunohistoquímicas (Agg, Col I y Col II) del modelo. H-E del control (Ctrl) de lesión y del control sin células. B) Valoración obtenida por el modelo en la escala *ICRS II* modificada.

El segundo criterio evaluado ha sido la tinción de la matriz mediante SO, en el que se otorgaron valores desde 0%, réplica 1, hasta 35% en la 2 (Figura 47).

Mediante tinción con H-E se analizaron los parámetros de morfología celular y presencia de grupos isogénicos. En la réplica 1, el 10% de las células eran redondeadas mientras que en las réplicas 2 y 3, se encontró que aproximadamente el 50-55% de las células presentes en el neot Tejido presentaban morfología redondeada (Figura 47 A). En ninguna de las réplicas se observaron grupos isogénicos en el neot Tejido, por lo que el valor asignado fue del 100% (Figura 47 B).

El siguiente ítem analizado ha sido la arquitectura superficial. En la réplica 1 se observaron disrupciones en la superficie (5%); en la réplica 2, la superficie superior era más lisa que la inferior (50%); la réplica 3 mostró una superficie bastante lisa y sin disrupciones (valor 80%) (Figura 47).

El último criterio a analizar fue la integración del neot Tejido con el cartílago nativo, en los que se otorgaron valores de entre 0% (réplica 1) a 75-90% (réplicas 2 y 3, respectivamente) (Figura 47).

Finalmente, la calificación general se realizó como la media aritmética de los valores asignados a los seis parámetros anteriormente analizados. Así, la valoración general de la réplica 1 ha sido del 19%, ya que no se ha formado un tejido adecuado; la valoración de la réplica 2 ha sido del 52%, indicando que el neot Tejido formado es fibrocartílago; la mejor de las réplicas, la 3, obtuvo una valoración intermedia entre fibrocartílago y cartílago hialino (valor del 70%) (Figura 47 B).

Además, las réplicas se inmunotñeron para Col I, Col II y *Agg*. El contenido de Col, en los tejidos de reparación, estaba ausente en la réplica 1, mientras que en las réplicas 2 y 3 ambos tipos de Col estaban presentes en la MEC. Del mismo modo, el *Agg* no se detectó en la réplica 1 pero sí en las otras dos réplicas (Figura 47 A).







Desde su aparición, la IT ha evolucionado como un campo multidisciplinar con el objetivo de desarrollar sustitutos biológicos capaces de recuperar, reemplazar o regenerar tejidos defectuosos (Chan y Leong, 2008). La IT osteocondral, utilizando soportes biodegradables, células y factores celulares, se centra en la formación de un neot Tejido con propiedades bioquímicas, estructurales, morfológicas y funcionales similares a las que presenta el cartílago hialino o el hueso endógeno, para su posterior implantación *in vivo* (Fuentes-Boquete y col., 2008; Xu y col., 2012). La elección, tanto del tipo celular como del biomaterial más apropiado, es el aspecto más importante de la Ingeniería del cartílago y del hueso (Cavallo y col., 2012). No obstante, los constructos que se han obtenido mediante IT todavía presentan características de fibrocartílago o hipertrofia (Tuli y col., 2003).

### FACTORES BIOACTIVOS

Los factores de crecimiento de la superfamilia del  $TGF\beta$  son efectivos induciendo la condrogénesis *in vivo* (Hunziker, 2002). Sin embargo, uno de los grandes problemas de este factor es que su uso *in vitro* ha favorecido un fenotipo hipertrófico de las CMEs diferenciadas (Bian y col., 2011). En este trabajo se ha testado, en diferentes tipos celulares, si existe hipertrofia en la condrogénesis inducida por  $TGF\beta$ . Además, los constructos de Col I y HS se cultivaron con  $TGF\beta$  en combinación con  $PTHrP$ , factor anti-hipertrófico (Lee e Im, 2012).

### TIPOS CELULARES

En algunos casos, el uso de condrocitos en la TC del cartílago provee una buena calidad de reparación del tejido (Facchini y col., 2006). En otros casos, resulta en la formación de un tejido que difiere histológicamente del cartílago nativo (De Franceschi y col., 2005). Además, su empleo está limitado a la reparación de pequeños daños focales (Facchini y col., 2006). El uso de condrocitos autólogos también implica el uso de técnicas invasivas para extraer cartílago sano (Fuentes-Boquete y col., 2008). Estos problemas han dado lugar a la necesidad de mejorar el conocimiento de tipos celulares alternativos, como las CMEs. Las aplicaciones de las CMEs en IT, resultan

optimistas en futuras terapias para tejidos como el hueso o el cartílago (Adamzyk y col., 2013).

### **Células mesenquimales estromales humanas**

De acuerdo a las pautas internacionales (Dominici y col., 2006), las CMEs-MO deben de ser positivas (>95%) para CD73 y CD105. En este estudio, aún cuando los marcadores CD73 y CD105 no superaron la positividad del 95%, estas células han cumplido con todos los demás requerimientos para ser consideradas CMEs-MO: positividad alta para CD90, falta de positividad para CD34 y CD45 y capacidad de diferenciación multipotente. Esta diferencia puede ser debida a la avanzada edad de los donantes y a que todos ellos presentaban OA severa (reemplazamientos de cadera debidos a un estadio avanzado de OA). En trabajos previos, en diferentes tejidos de la articulación, se encontraron diferencias en la positividad de marcadores de superficie entre CMEs de donantes sanos y OA (Hermida-Gómez y col., 2011; Cicione y col., 2013).

### **Células mesenquimales estromales ovinas**

Antes de testar la validez de constructos celulares en un modelo *in vivo*, es necesario realizar estudios exhaustivos de las células y tejidos del animal *in vitro*. A pesar del reciente incremento en el uso de la oveja como modelo animal grande para la IT, debido a las similitudes con los humanos en tamaño, arquitectura de la articulación y mecanismos de reparación (McCarty y col., 2009), la caracterización de las oCMEs ha sido muy escasa con respecto a la de las CMEs humanas (Rentsch y col., 2010). Incluso, en algunos trabajos se asume que las células obtenidas de la MO ovina, mediante aspirados de cresta ilíaca, son oCMEs y se omite el proceso de caracterización (Zscharnack y col., 2010). También, debido a que la secuenciación completa del genoma de oveja no se publicó hasta el año 2014 (Jiang y col., 2014), muchos estudios de *qRT-PCR* utilizaron cebadores para otras especies como la humana o bovina, entre otras (McCarty y col., 2009; Zscharnack y col., 2010; Endres y col., 2012). En este estudio se diseñaron cebadores específicos ovinos para analizar los genes característicos de cada linaje celular. Además, a diferencia de otros trabajos,

también se analizó la expresión de genes de indiferenciación. Otro problema es que existe muy poca información sobre el perfil de marcadores de superficie de las oCMEs, debido a la limitada disponibilidad de Ac específicos de oveja (McCarty y col., 2009).

Uno de los primeros puntos a tener en cuenta y resolver en este trabajo ha sido realizar una caracterización morfológica, inmunofenotípica y funcional de las oCMEs.

- Caracterización morfológica de las oCMEs

En este estudio, a diferencia de las CMEs-MO que se obtuvieron a partir de lavados de médula de cabezas femorales, las oCMEs se aislaron de aspirados de cresta ilíaca, por ser la metodología más ampliamente utilizada en la literatura para obtener las células de la MO en oveja (Schulz y col., 2008; McCarty y col., 2009; Reichert y col., 2010; Rentsch y col., 2010; Zscharnack y col., 2010; Boos y col., 2011; Al Faqeh y col., 2012; Song y col., 2014). Para el aislamiento de las oCMEs, se utilizó un protocolo más simple que los descritos en la literatura, como el gradiente de densidad o la lisis eritrocitaria (Schulz y col., 2008; McCarty y col., 2009; Niemeyer y col., 2010; Rentsch y col., 2010; Rozemuller y col., 2010; Zscharnack y col., 2010; Somers y col., 2012; Zhao y col., 2012; Adamzyk y col., 2013). Como se ha descrito previamente, en este trabajo se observó que estas células presentaban prolongaciones citoplasmáticas, adherencia al plástico de los frascos de cultivo y morfología típica fibroblástica, al igual que las CMEs-MO (Rentsch y col., 2010; Al Faqeh y col., 2012; McCarty y col., 2009). Aunque en este estudio no se analizó en profundidad, se percibió lo descrito en la literatura para las oCMEs: un tamaño menor (Rentsch y col., 2010), una tasa de proliferación mayor y una vida media más larga (Zannettino y col., 2010) que las CMEs humanas.

- Caracterización inmunofenotípica las oCMEs

Las oCMEs-MO presentaron una gran positividad para los Ac humanos CD29 y CD166 y para el Ac ovino CD44, marcadores que

se han descrito positivos en estas células con anterioridad (McCarty y col., 2009; Reichert y col., 2010; Zannettino y col., 2010; Boos y col., 2011; Zhao y col., 2012). También se encontró positividad para el marcador embrionario humano *SSEA4*, pero sólo en los especímenes más jóvenes. Previamente, estos marcadores han sido asociados con CMEs procedentes de diferentes tejidos (Reichert y col., 2010). Algunos estudios han mostrado positividad para CD44 (Mrugala y col., 2008), CD73 (Martínez-Lorenzo y col., 2009; Adamzyk y col., 2013), CD90 (Martínez-Lorenzo y col., 2009) y CD105 (Mrugala y col., 2008; Martínez-Lorenzo y col., 2009), utilizando Ac humanos. Sin embargo, en el presente estudio, al igual que en otros descritos en la literatura, no se observó positividad de las oCMEs para los Ac humanos CD73 (Rozemuller y col., 2010), CD90 (McCarty y col., 2009; Rozemuller y col., 2010) y CD105 (McCarty y col., 2009; Rozemuller y col., 2010; Zhao y col., 2012). Esta ausencia de expresión posiblemente sea debida a que los Ac humanos no presentan reactividad cruzada con los antígenos ovinos. Así, cuando se utilizan Ac humanos, la ausencia de expresión debe de ser interpretada con precaución (Boxall y Jones, 2012), por lo que en este estudio no podemos afirmar la ausencia de los marcadores en los que no obtuvimos positividad. En coherencia con la literatura consultada, las oCMEs no presentaron positividad para CD45 (Mrugala y col., 2008; McCarty y col., 2009; Zhao y col., 2012), indicando que las células no eran de origen hematopoyético. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados, el perfil de antígenos celulares de superficie de las oCMEs es similar al de las CMEs-MO humanas.

- Caracterización funcional de las oCMEs

Los estudios de diferenciación de oCMEs son muy incompletos ya que, o no se realiza ninguna caracterización funcional de estas células (Schulz y col., 2008; Zscharnack y col., 2010), o sólo se testa su potencial de diferenciación hacia un único linaje celular (Martínez-Lorenzo y col., 2009; Reichert y col., 2010). Al igual que en este trabajo, en algunos artículos sí se analizó la capacidad de

diferenciación hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico (Mrugala y col., 2008; McCarty y col., 2009; Rentsch y col., 2010; Zannettino y col., 2010; Somers y col., 2012; Zhao y col., 2012; Ude y col., 2014).

Para llevar a cabo la adipogénesis de las oCMEs, inicialmente se utilizó el medio de diferenciación comercial indicado para células humanas sin éxito (datos no mostrados), confirmando los resultados obtenidos por otros autores (Mrugala y col., 2008). Estudios previos sugirieron que los estímulos necesarios para inducir la adipogénesis son diferentes en las CMEs humanas que en las ovinas (Mrugala y col., 2008). Tras una revisión de varios trabajos (Mrugala y col., 2008; Zebisch y col., 2012; Ude y col., 2014), en el presente estudio se complementó el medio adipogénico con rosiglitazona, para desencadenar el proceso de diferenciación. Gracias a ello, se pudieron observar vacuolas lipídicas citoplasmáticas teñidas con *Oil Red O*. Esta tinción fue menor en las diferenciaciones de las oCMEs-MO que en las CMEs-MO. Sin embargo, en la expresión génica se observó un incremento en la expresión de genes característicos de adipocitos (*ADPN* y *FABP4*), siendo mayor que en CMEs-MO. También se observó una disminución de los genes de indiferenciación (*VIM* y *SOX2*). Estos resultados están en concordancia con los publicados anteriormente sobre la complementación de los medios de diferenciación adipogénica en células ovinas (Mrugala y col., 2008; McCarty y col., 2009; Rentsch y col., 2010; Zannettino y col., 2010; Lyahyai y col., 2012; Somers y col., 2012; Zhao y col., 2012). El efecto del medio de cultivo en la diferenciación adipogénica de las oCMEs fue estudiado por Adamzyk y col. (2013) y encontraron que no había variaciones debido a los especímenes pero sí debidos al medio.

En el caso de la osteogénesis, Adamzyk y col. (2013) sí encontraron variaciones debidas al espécimen, al protocolo de diferenciación y al medio de cultivo previo a la diferenciación. Tras 21 días de estimulación osteogénica, en el presente trabajo se observó la presencia de calcificación y un incremento en la expresión génica de

OP, como se describió anteriormente (Mrugala y col., 2008; McCarty y col., 2009; Reichert y col., 2010; Rentsch y col., 2010; Zannettino y col., 2010; Lyahyai y col., 2012; Zhao y col., 2012; Ude y col., 2014). Además, tras 21 días en medio de cultivo control también se observó poca tinción con Rojo Alizarina y un ligero incremento de la expresión de OP. Estos datos concuerdan con los observados por Mrugala y col. (2008) que también obtuvieron altos niveles basales de OP, en ausencia de estimulación. Esto puede ser debido a que el SBF incluido en el medio de cultivo, tiene factores de crecimiento que pueden estimular la osteogénesis (Lindroos y col., 2010). Sin embargo, en las CMEs-MO cultivadas en *DMEM*20% no se observó ni tinción con Rojo Alizarina ni altos niveles de expresión de genes osteogénicos, a pesar de que también había SBF en el medio de cultivo. Sorprendentemente, en las oCMEs estimuladas la expresión de VIM fue elevada, lo que puede indicar la presencia de oCMEs indiferenciadas junto con las células diferenciadas.

Las oCMEs analizadas mostraron altos niveles de CD44, un marcador que aumenta la capacidad condrogénica (Grogan y col., 2007). La habilidad de las oCMEs y de las CMEs-MO, para diferenciarse condrogénicamente, se testó mediante formación de micromasas, lo que permite el contacto célula-célula y el incremento del Col II en la MEC (Jones y col., 2002; Ude y col., 2014). De forma similar a lo descrito anteriormente por Mrugala y col. (2008), se observó que las oCMEs, al igual que las CMEs-MO, fueron capaces de diferenciarse condrogénicamente cuando se le añadió *TGFβ3* al medio de diferenciación. Otros autores no observaron buena diferenciación utilizando sólo *TGFβ*, pero sí complementándolo con *BMP-6* (Martínez-Lorenzo y col., 2009).

Se ha descrito en la literatura que la formación de micromasas, mediante centrifugación, favorece la indiferenciación y necrosis celular en la región central, además de una alta expresión de Col I (Panadero y col., 2016). Sin embargo, en este estudio se utilizó este método para todos los tipos celulares y se observó un tejido



homogéneo, con presencia de PGs y Col en la MEC. Mediante inmunohistoquímica se detectó tanto presencia de Col II como de Col I y, por medio del análisis molecular, se observó una expresión incrementada de COL2 frente a la de COL1, con respecto a los controles. La expresión de AGG, el principal PG en la MEC del cartílago ovino y humano, fue sólo evidente en las oCMEs y CMEs-MO estimuladas, indicando que realmente tuvo lugar un proceso condrogénico.

### **Células similares a mesenquimales estromales**

Algunos autores han sugerido que la edad y la potencia celular de las CMEs pueden ser factores limitantes para una correcta diferenciación condrogénica (Wang y col., 2009). Las células pluripotentes pueden proveer un número ilimitado de células especializadas. Las *iPS* parecen una buena alternativa a las CMEs para la IT del cartílago, salvo por el riesgo de formación de teratomas. La derivación de CSMEs a partir de *iPS* (Zhang y col., 2011; Liu y col., 2012; Villa-Díaz y col., 2012; Frobel y col., 2014) pueden evitar tanto el riesgo en la formación de teratomas, como los problemas de las CMEs derivados de la dependencia de la edad o de la senescencia celular del cultivo *in vitro* (Mimeault y Batra, 2009; Wagner y col., 2009).

- **Caracterización morfológica de las CSMEs**

Como primer paso de diferenciación, la mayor parte de los protocolos de cultivo describen la derivación de las *iPS* hacia CSMEs utilizando (Medvedev y col., 2011; Liu y col., 2012; Villa-Díaz y col., 2012; Koyama y col., 2013; Liu y col., 2014) o sin utilizar (Liu y col., 2012) la formación de *EBs*. El empleo de *EBs* tiene ciertas limitaciones, como la dificultad de estudiar los mecanismos de diferenciación utilizando células independientes y la dificultad de controlar su tamaño y número (Inui y col., 2012). En este estudio se han comparado dos tipos de derivaciones de los *EBs*, descritas en la literatura: la derivación sembrando de forma conjunta los *EBs* (NC-CSMEs) (Medvedev y col., 2011; Koyama y col., 2013) y la derivación de *EBs* sembrados de

forma independiente (C-CSMEs) (Liu y col., 2014). En ambos tipos de derivaciones se obtuvieron células con morfología fibroblástica.

- Caracterización inmunofenotípica de las CSMEs

A diferencia de otros estudios (Liu y col., 2012), en el presente trabajo se han comparado las CSMEs con CMEs. Cuando se realizaron los análisis de expresión de marcadores de superficie, no se observaron diferencias entre las NC-CSMEs y las C-CSMEs. Al igual que estudios previos de caracterización de las CSMEs mediante citometría de flujo, se encontró que las CSMEs eran altamente positivas para CD29 (Zhang y col., 2011; Villa-Díaz y col., 2012; Frobel y col., 2014), CD44 (Zhang y col., 2011) y CD73 (Zhang y col., 2011; Liu y col., 2012; Villa-Díaz y col., 2012; Frobel y col., 2014) y negativas para el marcador hematopoyético CD34 (Liu y col., 2012; Villa-Díaz y col., 2012; Frobel y col., 2014). El CD105 se ha descrito como altamente expresado (Liu y col., 2012; Villa-Díaz y col., 2012) o poco expresado (Frobel y col., 2014), sin embargo, en este estudio se observó una alta expresión. Al igual que las CMEs, cuando se cultivan *in vitro*, las CSMEs tienen una expresión alta de CD90 y baja de CD271 (Boxall y Jones, 2012). Zhang y col. (2011) concluyeron que los marcadores de superficie de las CSMEs eran más similares a los de las células derivadas de ESCs que a las CMEs-MO. Los resultados de Zhang y col. (2011) concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en relación a los análisis de citometría y de capacidad multipotente (datos no mostrados). Sin embargo, esto no supone un problema, ya que las ESCs presentan un gran potencial tanto osteogénico como condrogénico (Barberi y col., 2005; Hwang y col., 2006; Oldershaw y col., 2010; Toh y col., 2010).

- Caracterización funcional de las CSMEs.

En concordancia con los resultados obtenidos por Frobel y col. (2014), en el presente estudio se encontró que las CSMEs no presentaban capacidad de diferenciación adipogénica. Esto puede deberse a que estas células se hayan comprometidas hacia una

diferenciación osteo- condro- progenitora. Sin embargo, Liu y col. (2012) observaron diferenciación hacia los tres linajes celulares.

De la misma forma que las CMEs aisladas de sus nichos son poblaciones heterogéneas, en anteriores estudios se han establecido metodologías para minimizar la heterogeneidad celular sin limitar las capacidades multipotentes (Hwang y col., 2006; Arufe y col., 2010; Oldershaw y col., 2010; Liu y col., 2012; Guzzo y col., 2013; Koyama y col., 2013). Para evitar los problemas derivados de la heterogeneidad entre *EBs*, en este estudio se ha testado su crecimiento independiente hasta generar C-CSMEs. Cada *EB* fue expandido de forma independiente y cuando se analizó la capacidad condrogénica, se observó que era mayor al reducir la heterogeneidad. Por el contrario, cuanto más heterogeneidad presentaron las células (NC-CSMEs), mayor capacidad osteogénica poseían.

Estos resultados indican la necesidad de futuros estudios que corroboren el potencial de las C-CSMEs para su uso en la Ingeniería del cartílago, así como el de las NC-CSMEs en la IT del hueso.

### CONSTRUCTOS PARA LA INGENIERÍA DEL CARTÍLAGO

Está ampliamente aceptado que los sistemas de cultivo tridimensionales *in vitro* pueden imitar la situación *in vivo* mejor que los cultivos bidimensionales (Seo y Na, 2011). Aunque el cultivo de micromasas se ha considerado un modelo útil de condrogénesis, su uso como terapia no es adecuado (Panadero y col., 2016). Los soportes pueden proveer una estructura tridimensional apropiada para soportar la viabilidad celular y la proliferación, mantener el fenotipo celular específico y permitir la diferenciación celular. Las CMEs, cuando se usan en combinación con los soportes y factores de crecimiento adecuados, pueden tener un gran impacto en la reparación del cartílago (Chen y col., 2011).

#### **Tipos de soportes**

El uso de compuestos naturales, que imitan la MEC nativa, como biomateriales provee una ventaja sobre los materiales semi-sintéticos debido

a su limitada bioactividad intrínseca (Schagemann y col., 2013). El Col es una proteína que se encuentra en una concentración alta en una variedad de tejidos (Parenteau-Bareil y col., 2010) y tiene varias propiedades útiles en la IT. Una de las propiedades es la biodegradabilidad, ya que puede ser degradado *in situ* mediante colagenasas endógenas (Tedder y col., 2009) y su degradación no produce metabolitos tóxicos (Hunziker, 2002). Además, el Col puede ser reconstituido en estructuras fibrosas simulando a las de la MEC en los tejidos nativos (Chan y Leong, 2008), de forma similar a las esponjas de Col equino que se utilizaron en este trabajo. Los biomateriales naturales xenogénicos pueden causar rechazo inmunológico cuando se implantan (Tuli y col., 2003; Chan y Leong, 2008), pero el Col posee una gran cito- y bio- compatibilidad (Chan y Leong, 2008; Xu y col., 2012). Además, el uso de Col xenogénico evita la contaminación viral (De Franceschi y col., 2005). En este estudio, se testaron biomateriales compuestos sólo por Col I y otros compuestos por Col I y Col II. Aunque el Col II es el mayor elemento estructural de la MEC del cartílago, el Col I es menos reactivo inmunológicamente cuando se implanta en un receptor (De Franceschi y col., 2005). Sin embargo, el uso de soportes de Col supone un problema debido a su pobre resistencia mecánica, siendo necesaria su combinación con otros componentes para mejorarla (Tortelli y Cancedda, 2009). La unión de GAGs a los biomateriales puede ofrecer un ambiente más apropiado para la señalización celular. Además, las matrices de GAGs modulan el rechazo del neot Tejido por parte del receptor. Por otro lado, el potencial de estos soportes reside en sus diferentes propiedades bioquímicas que los hacen compatibles con las áreas de implantación (Pieper y col., 2000). Por ello, en este estudio se compararon los biomateriales compuestos sólo con Col, con otros de Col combinado con elementos típicos de la MEC del cartílago como el HS, el CHS y la heparina.

- Influencia de las propiedades de los soportes sobre las CMEs

La síntesis del neot Tejido debe de tener lugar gradualmente, al mismo tiempo que el soporte se degrada, manteniendo así la integridad estructural del tejido neoformado (Negri y col., 2007). Así, idealmente, el biomaterial debe degradarse con un ratio que optimice el

crecimiento celular y el desarrollo del neot Tejido. En general, los biomateriales empleados en este estudio presentan una degradación lenta, a excepción de Col I, degradándose lo suficientemente rápido para permitir la colonización por el nuevo tejido en formación.

Otras característica que debe presentar un biomaterial es la capacidad de facilitar la infiltración, adhesión, proliferación y diferenciación de las células (Tuli y col., 2003). Tanto en el estudio inmunohistoquímico de los soportes de Col I y HS como en los de Col I y Col II se observó que las CMEs-MO no sólo se habían adherido al soporte, si no que también habían proliferado. Los mayores porcentajes de proliferación celular se observaron en los constructos con HS. Está descrito que el HS se une a una gran cantidad de componentes, de la MEC y la membrana basal, y también funciona como co-receptor de muchos factores de crecimiento. Estas biocaracterísticas indican un papel principal de los GAGs en fenómenos biológicos básicos como adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular (Pieper y col., 2000).

Los soportes deben de ser lo suficientemente porosos para permitir el transporte eficiente de nutrientes y metabolitos (Negri y col., 2007; Chan y Leong, 2008; Kock y col., 2012), pero sin que afecte a la adhesión o crecimiento celular. Histológicamente, se detectó que las células cultivadas en Col I y Col I +HS, con medio de estimulación condrogénico, crecieron homogéneamente a través del biomaterial y depositaron una gran cantidad de MEC. Pero, en los constructos de Col I +HS que se cultivaron sin estímulos condrogénicos, las células con morfología fibroblástica se localizaron sólo en la superficie de los biomateriales y, tras 30 días, se detectó poca MEC. Wang y col. (2012) sugirieron que los biomateriales compuestos por Col I mejoran la hidrofilia del soporte, permitiendo una mejor adhesión celular, proliferación y diferenciación. Sin embargo, las CMEs-MO mostraron mejor capacidad de adhesión celular y síntesis de MEC en los biomateriales compuestos tanto por Col I como por Col II (Col I +Col II, Col I +Col II +HS, Col I +Col II +CHS) que en los que sólo estaban

compuestos por Col I (Col I +OLH3, Col I +CHS). Esto puede ser debido a que los soportes que no contenían Col II mostraron tamaños de poro más grandes y por ello también mostraron un crecimiento celular heterogéneo en el soporte. Estudios previos han mostrado heterogeneidad en la proliferación celular, deposición de MEC o diferenciación celular, entre las partes central y periférica de los constructos, cuando la porosidad del soporte era la inadecuada (Lee y col., 2006; Markway y col., 2010; Ragetly y col., 2010; Scotti y col., 2010; Zhang y col., 2012). El tamaño de poro de los soportes es un factor importante para evitar la salida de nuevas proteínas y PGs sintetizados (Mouw y col., 2005). Las grandes cantidades de Col que se detectaron en los sobrenadantes de Col I +OLH3 y Col I +CHS se pueden explicar por este fenómeno, debido a su gran tamaño de poro. Diversos estudios han encontrado que el uso de CHS en los biomateriales promueve la secreción de Col II (He y col., 2012). Esto concuerda con los resultados encontrados en los análisis de liberación de Col, ya que se encontraron dos picos de liberación en los soportes con CHS, mientras que en los demás sólo se encontró uno. En los biomateriales con CHS se observó un primer pico al inicio de los cultivos, lo cual indica que se promueve una secreción inmediata de los componentes de la MEC. Histológicamente, se encontró Col II en la MEC de los constructos de Col I y Col II. El Col I se detectó en estos constructos pero en niveles más bajos en el biomaterial con CHS (Col I +Col II +CHS). Se ha descrito que el uso de CHS en los biomateriales regula la expresión de genes y del fenotipo característicos de condrocitos (Lee y col., 2006; Varghese y col., 2008; Kagita y col., 2010).

- Diferenciación condrogénica de las CMEs sobre los soportes

Olsen y col. (2007) describieron que el estado anabólico o catabólico de los condrocitos *ex vivo* se refleja en el metabolismo del Col II, cuantificado en el sobrenadante. Sin embargo, en este estudio sólo se detectó Col en los constructos cultivados en medio condrogénico y no en los cultivados en medio sin estimulación. En el presente trabajo

parece que la liberación de Col está ligada a la inducción condrogénica y neosíntesis del tejido. Esto concuerda con lo observado mediante microscopía electrónica, en la que se determinó que las células presentaban una alta actividad secretora y muchas mitocondrias, características de células en diferenciación (Danišovič y col., 2007). En estudios de CMEs cultivadas sobre biomateriales de Col I y Col III y de ácido poliglicólico (*PGA, Polyglycolic acid*), también se detectó mayor liberación de GAGs en sobrenadantes de los constructos estimulados que en los controles (Kohli y col., 2015). Aunque en este estudio también se realizó un ensayo colorimétrico para la detección de GAGs en los sobrenadantes de los constructos, no se detectaron en ninguno de los grupos (datos no mostrados).

La estructura y composición del cartílago articular hialino varía de acuerdo a su distancia con la superficie y los condrocitos de las diferentes zonas varían en tamaño, forma y actividad metabólica (Newman, 1998). Mediante histología y microscopía electrónica, se observaron células con morfologías oval/redondeada y aplanadas y MEC en los constructos condrogénicos de Col I y HS y en los de Col I y Col II. Estudios de microscopía electrónica del cartílago (Poole y col., 1987) mostraron condrocitos con una morfología aplanada y sin evidencia de cápsula pericelular en las capas superficiales del cartílago. En los constructos de Col I +Col II +*CHS* se observaron fibras de Col con disposición horizontal mediante MET, similares a las que se observan en la zona superficial del cartílago (Khoshgoftar y col., 2011).

El Col II es un marcador típico de cartílago hialino (Negri y col., 2007) y una MEC rica en PGs es también el distintivo de la condrogénesis (Tew y col., 2008). Mediante inmunohistoquímica, en los constructos de Col +HS la intensidad de tinción de Col II en la MEC fue fuerte en todos los grupos de estudio a 30 días de cultivo. Además, no se detectó diferencia de expresión de COL2, con respecto a los controles. Sin embargo, la expresión génica de SOX9 y AGG fue mayor en la mayoría de constructos diferenciados, observándose *Agg*

sólo en la MEC de unos pocos constructos estimulados, a 30 días. Lo que sugiere la neoformación de un tejido condrogénico en estos biomateriales. Estudios previos sugieren que la adición de Col II de forma exógena a los cultivos de CMEs mejora la condrogénesis con respecto a la adición de Col I (Chen y col., 2005). No obstante, aunque en los constructos de Col I y Col II se observó expresión génica de COL2 y AGG, no se detectó Agg mediante inmunohistoquímica, aunque mostraron positividad fuerte para la tinción con SO. En comparación con los biomateriales de Col I +OLH3 y Col I +CHS, las CMEs-MO en los biomateriales compuestos por Col II presentaron mayor síntesis de PGs. Wong y col. (2010) encontraron mayor deposición de GAGs en los cultivos de condrocitos en respuesta a la adición de Col II al medio de cultivo. Chen y col. (2005) concluyeron que el Col II en el medio de cultivo permite la síntesis de GAGs pero que el Col I disminuye la expresión de AGG, SOX9 y COL2. Sin embargo, en este estudio la presencia de Col I en estos biomateriales parece disminuir la expresión de AGG, en comparación con los biomateriales de Col I +Col II, pero la expresión de SOX9 y COL2 no se vio afectada. No obstante, también se ha descrito que la expresión del AGG varía entre donantes (Grigolo y col., 2002a).

Tradicionalmente, el Col I en los tejidos es indicativo de la presencia de fibrocartílago. En general, en los constructos de Col I +HS se observó poca presencia de Col I en la MEC. En los constructos de Col I +Col II, la expresión más notable de COL1 se observó en los biomateriales de Col I +Col II +HS, mientras que en los de Col I +Col II +CHS la expresión estaba disminuida. Asimismo, la presencia de Col X es indicativa de un tejido hipertrófico. Tanto por inmunohistoquímica como por biología molecular se confirmaron niveles de expresión de Col X más altos en los biomateriales sólo con Col I +Col II que en los compuestos de HS, CHS o heparina. En cuanto a los constructos de Col I +HS, por inmunohistoquímica se observó que el Col X estaba presente en la mayor parte de los estimulados y los no estimulados. Algunos autores encontraron que el



uso de *CHS* en la IT del cartílago previene la hipertrofia (Kagita y col., 2010; Chen y col., 2015). Se ha descrito que la hipertrofia condrogénica se puede evitar empleando estrategias específicas a nivel proteico/génico, durante el proceso de expansión y/o de diferenciación condrogénica (Chen y col., 2015). Por ejemplo, mediante la inhibición de la vía de señalización *WNT* o modulando la vía de señalización *TGFβ/Smad* (Hellingman y col., 2012). También, se han utilizado isoformas específicas del *PTHrP* durante la diferenciación condrogénica (Lee e Im, 2012; Narcisi y col., 2015). Sin embargo, en los constructos de Col I +HS, tanto estimulados como sin estimular, el uso de *PTHrP* no disminuyó la expresión de Col X, ni evitó un leve grado de mineralización en los constructos control. No obstante, se ha visto que la expresión del Col X se incrementa durante el cultivo *in vitro* de las CMEs (Kock y col. 2012). Mwale y col. (2006) encontró Col X en CMEs indiferenciadas por lo que concluyó que el Col X no era un buen marcador de hipertrofia durante la diferenciación temprana de las CMEs. También, el incremento de la expresión de COL1 con frecuencia se ha visto relacionado con la diferenciación condrogénica de las CMEs *in vitro* y con CMEs pre-condrogénicas (Grigolo y col., 2002b; López-Ruiz y col., 2013). Por tanto, el Col I y el Col X pueden estar indicando la presencia de CMEs indiferenciadas dentro de los constructos, mezcladas con células diferenciadas, como se ha podido observar mediante microscopía electrónica. Esto puede ser debido a que durante la condrogénesis las células no detienen su proliferación (Lisignoli y col., 2005). Además, se pudo confirmar que no hubo hipertrofia en los constructos ya que apenas se detectó *MMP13* tanto en los constructos de Col I como en los de Col I y Col II. Tampoco se encontró mineralización con la tinción de *VK* en todos los constructos, salvo en Col I+1%HS en *DMEM20%*, tras 30 días de cultivo. Hellingman y col., (2012) demostraron que un alto nivel de mineralización *in vitro* no implica la mineralización *in vivo*. Otro estudio mostró que la calcificación puede ser debida a variaciones en la tensión superficial del  $O_2$  o al pH del medio de cultivo (Abrahamsson y col., 2010).

### Capacidad de reparación de los constructos condrogénicos en los modelos de lesión

- El modelo humano

La presencia de algunas CMEs indiferenciadas o de células similares a condrocitos, sin una organización zonal, puede ser una ventaja en la IT del cartílago, ya que un tejido inmaduro es capaz de madurar hacia un tejido normal cuando se implanta en la articulación (Pabbruwe y col., 2009). Como el fenotipo celular y la MEC varía zonalmente en el cartílago (Newman, 1998), una vez implantados los constructos se ven influenciados por el metabolismo de las células nativas de cada región (Negri y col., 2007). Además, otra de las características que deben presentar los biomateriales es la habilidad para integrarse en el cartílago nativo (Gloria y col., 2010; Dhollander y col., 2012). Sin embargo, la mayor parte de los estudios testan sólo el crecimiento y diferenciación de las células en los soportes, sin estudiar los constructos dentro del ambiente del cartílago nativo. El testado *in vitro* provee información estandarizada y cuantificable sobre citotoxicidad, proliferación celular y capacidad de diferenciación de una manera más fácil que el testado *in vivo* (Lutianov y col., 2011). Por ello, en este trabajo se realizó un modelo *in vitro* de lesión de cartílago humano, para testar la capacidad de reparación de diferentes constructos dentro del ambiente nativo. Los constructos considerados para este estudio fueron los que mostraron mejores valores histológicos e inmunohistoquímicos en las caracterizaciones previas: Col I, Col I +3%HS, Col I +Col II +HS y Col I +Col II +CHS. Este estudio sólo se realizó durante dos meses, tiempo menor que el descrito en la literatura (Lutianov y col., 2011). Modelos matemáticos han predicho periodos de tiempo *in vivo* de al menos 18 meses para obtener una maduración completa del cartílago. Esto concuerda con los estudios clínicos que demuestran que la reparación del cartílago es un proceso lento (Lutianov y col., 2011). Sin embargo, periodos de tiempo más largos pueden incrementar considerablemente el riesgo

de contaminación del cultivo *in vitro* y la degradación del cartílago (Fuentes-Boquete y col., 2008).

Este modelo permite analizar muestras de cartílago del mismo donante, utilizando diferentes variables de estudio, y testar diferentes constructos generados en el ambiente del cartílago nativo. En primer lugar, se realizó un cultivo de los diferentes constructos en el modelo de lesión, en medio condrogénico. Utilizando la escala modificada *ICRSII* (Mainil-Varlet y col., 2010), los valores obtenidos en este modelo fueron de aproximadamente el 50% (fibrocartílago) de un total de 100% (cartílago hialino), mediante el uso de todos los constructos a excepción del Col I +Col II +HS (fibrocartílago/cartílago hialino, 73%). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en algunos estudios clínicos, analizados mediante la escala *ICRS*, en los que se utilizó como tratamiento la microfractura (Deng y col., 2016).

Se ha descrito que la implantación de condrocitos dentro de los defectos es susceptible a la inflamación anormal y al ambiente mecánico que subyace en la OA y que, eventualmente, puede comprometer la integración, función y longevidad del cartílago regenerado (Wang y col., 2011). Los niveles de IL1 $\beta$  son elevados en los pacientes con OA (Khan y col., 2011). Por ello, en segundo lugar, en el modelo de lesión, previo al cultivo en medio condrogénico de los diferentes constructos, se realizó un pre-tratamiento con IL1 $\beta$ . Tras el análisis utilizando la escala modificada *ICRSII*, se ha visto una disminución de aproximadamente un 10-20% en los valores de la escala asignados a Col I y Col I +Col II +HS, respectivamente. Esta disminución se basa principalmente en la pérdida de componentes típicos en la MEC y en cambios morfológicos. Diferentes estudios han mostrado *in vivo* que la inyección de IL1 $\beta$ , en articulaciones, da lugar a la degradación del Col y los PGs de la MEC (Khan y col., 2011). En cuanto a las réplicas de Col I +3%HS y Col I +Col II +CHS apenas se ha visto variaciones. Esto concuerda con los estudios previos en los que los biomateriales compuestos por CHS mejoraban las propiedades antiinflamatorias (Taraballi y col., 2016).

Es necesario considerar que la escala utilizada ha sido diseñada para evaluar la reparación osteocondral *in vivo* en humanos. También ha de tenerse en cuenta que la ausencia de estímulos mecánicos influye negativamente en la calidad del neot Tejido de reparación. El movimiento y las cargas mecánicas en la articulación son esenciales para el desarrollo y el mantenimiento de la estructura normal del cartílago (Khoshgoftar y col., 2011). El movimiento pasivo continuo se sabe que estimula la reparación de los defectos con un tejido de reparación similar al cartílago hialino (Newman, 1998). Para poder testar en un modelo animal *in vivo* la capacidad de reparación de estos constructos, es necesario estudiar la metodología de implantación. El soporte también debe de tener el potencial de anclarse en el lugar de la lesión (Seo y Na, 2011), sin embargo el movimiento articular puede dificultarlo. Por ello, se analizó la utilidad de un pegamento histológico que evite que el constructo se mueva de la lesión, una vez implantado en la articulación (datos no mostrados). No obstante, los resultados histológicos mostraron que el pegamento no sólo no ancló el constructo a la lesión, si no que parece tener un efecto negativo sobre el fenotipo celular y la deposición de MEC. Esto puede ser debido a que este tipo de pegamento libera productos tóxicos cuando se degrada (Schneider, 2009). Costa y col. (2006) han descrito que el uso de pegamentos histológicos de gelatina-resorcinol-formaldehído o, incluso las suturas, dan mejores resultados en explantes de cartílago que el empleado, el butil-2-cianocrilato (*Histoacryl*). Por lo que será necesario, en un futuro, profundizar en la mejora de esta metodología.

- El modelo ovino

En cuanto al testado de los constructos condrogénicos ovinos, diferentes autores (Schulz y col., 2008; Endres y col., 2012) han desarrollado estudios *in vitro* utilizando células ovinas y diferentes tipos de soportes, aunque sin el ambiente del cartílago nativo. En este estudio se ha realizado un modelo de lesión de cartílago ovino y se ha evaluado la reparación utilizando oCMEs y biomateriales de Col I.

Empleando la escala modificada *ICRSII*, el valor mostrado en la mejor réplica de este modelo fue del 70% (fibrocartílago/cartílago hialino) de un total de 100% (cartílago hialino), aunque en otras réplicas los valores fueron inferiores. Esta escala, al haber sido diseñada para evaluar la reparación osteocondral humana *in vivo*, sólo se han tenido en cuenta los parámetros histológicos. Por otro lado, en el cartílago humano la presencia de grupos isogénicos está asociado con un estado patológico mientras que en el cartílago ovino no, en donde es frecuente encontrar más de un condrocito por laguna (Mainil-Varlet y col., 2010; Endres y col., 2012). Otras limitaciones que presentan este estudio son el pequeño tamaño de la lesión, debido a la delgadez del cartílago ovino (Zscharnack y col., 2010), que puede contribuir a la variabilidad entre réplicas y, al igual que en los modelos humanos, el tiempo de cultivo y la ausencia de estímulos mecánicos. Todos estos inconvenientes se pueden evitar con la traslación del modelo de *in vitro* a *in vivo*.

### CONSTRUCTOS PARA LA INGENIERÍA DEL HUESO

Está aceptado en la IT que el análisis *in vitro* se utilice inicialmente como un primer testado para evitar el uso innecesario de animales (Pearce y col., 2007). No es posible mantener durante largos periodos de tiempo el cultivo de hueso, por ello es posible realizar modelos de reparación de cartílago pero no ósea.

#### **Tipos de soportes y su influencia sobre las oCMEs**

En este trabajo se testaron dos tipos de soportes ampliamente estudiados en la reparación ósea: el  $\beta$ -FTC y el Col I. La mayoría de estudios se han centrado en testar la biocompatibilidad del Col y en investigar tanto la proliferación como la diferenciación osteogénica en esponjas de Col (Tortelli y Cancedda, 2009). También, las cerámicas de  $\beta$ -FTC reabsorbibles son ampliamente utilizadas en cirugía ortopédica para el tratamiento de grandes fracturas de hueso (Zannettino y col., 2010) y en cirugía de defectos periodontales intraóseos (Cochran y col., 2016).

En el presente estudio, se observó mediante histología y microscopía electrónica mayor adhesión celular, deposición de MEC y fenotipo osteogénico en los constructos de Col I que en los de  $\beta$ -FTC. El-Jawhari y col. (2015) encontraron que la adición de Col a soportes de hueso bovino mejoraba la adhesión, supervivencia y proliferación celular. La diferencia en la adhesión celular puede ser debida a los altos niveles de expresión de CD29 por parte de las oCMEs, ya que algunas subclases están asociadas a una mayor eficiencia en la unión a biomateriales de Col (Zannettino y col., 2010). La microscopía electrónica mostró diferentes morfologías celulares tanto en los constructos de  $\beta$ -FTC como en los de Col. También, Schmitt y col. (2008) encontraron diferentes morfologías dependiendo de la topografía de los diferentes tipos de biomateriales. Así, en algunos soportes se observó que las células eran capaces de crecer dentro del biomaterial, mientras que en otros las células crecían en la superficie, manteniendo una forma más aplanada. En los constructos de  $\beta$ -FTC se observaron las oCMEs con morfología aplanada dispersas sobre la superficie del soporte, mientras que en los constructos de Col I las células crecieron dentro del biomaterial, debido a su porosidad.

- Diferenciación osteogénica de las oCMEs sobre los soportes

Mediante MET se observó que las oCMEs diferenciadas adquirían una morfología osteoblástica como se ha descrito anteriormente (Ozen y col., 2013). Desantis y col. (2015) encontraron dos tipos celulares en los agregados de oCMEs, electrón-densas y electrón-lúcidas, mientras que aquí solo se observó un tipo celular. En este sentido, las células diferenciadas en los constructos presentaban similitud con las electrón-lúcidas.

Histológicamente se pudieron observar osteoblastos en los constructos de Col. Su presencia también se confirmó inmunohistoquímicamente, ya que la OCN es una proteína ósea sintetizada exclusivamente por este tipo de células (Schmitt y col., 2008). La síntesis de OCN en esponjas de Col también fue descrita previamente (Tortelli y Cancedda, 2009). Además, las tinciones para

VK y Rojo Alizarina evidenciaron la presencia de sales de fosfato cálcico (Schmitt y col., 2008) y depósitos cálcicos (Gregory y col., 2004), en los espacios extracelulares.

Los análisis de EDX suponen una herramienta útil para la cuantificación de elementos en los tejidos, permitiendo detectar la cantidad de Ca y P en el hueso (Perdikouri y col., 2015). En este estudio, se cuantificó la presencia de fosfato cálcico presente en los constructos de Col. Se obtuvo el mismo ratio de Ca/P en los depósitos que el descrito previamente en modelos de reparación ósea en ratas (Perdikouri y col., 2015).

En el presente estudio, se ha podido confirmar la capacidad funcional de las CMEs que las hacen ser un tipo celular prometedor para la IT osteocondral. Por otro lado, se obtuvieron CSMEs, a partir de *iPS*, con capacidad osteogénica y condrogénica, por lo que son un tipo celular con potencial utilidad en la IT del hueso y el cartílago. Sin embargo, son necesarios estudios futuros que profundicen en este aspecto.

En cuanto a los soportes, se ha visto que los que están compuestos por Col permiten a las CMEs diferenciarse osteogénica y condrogénicamente. Además, la adición de PGs a la composición mejora el fenotipo del neot Tejido formado, lo cual se ha confirmado en los cultivos *in vitro*. No obstante, el comportamiento celular no solo varía debido al soporte si no, también, al ambiente extracelular. Por ello, en los modelos de reparación se ha observado una reparación aceptable utilizando los biomateriales de Col I +HS y Col I +Col II +CHS y una reparación buena con los de Col I +Col II +HS. Sin embargo, en presencia de enzimas catabólicas, en este caso la IL1 $\beta$ , afecta al neot Tejido y disminuye la capacidad de reparación. Éste y otros factores, como las cargas mecánicas, deben de tenerse en cuenta a la hora de proponer la IT como tratamiento. Por tanto, es necesario testar los constructos en un modelo de reparación en animales grandes, como la oveja. Tras demostrar *in vitro* la capacidad de diferenciación, tanto

osteogénica como condrogénica, de las oCMEs sobre los soportes de Col, es necesario testar en un futuro su éxito *in vivo*.



## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

---



**1. Las CMEs-MO humanas son útiles en la Ingeniería del cartílago.**

1.1. Las CMEs aisladas de la MO humana tienen capacidad de diferenciación multipotente.

1.2. De entre todos los biomateriales testados, las CMEs-MO han obtenido un tejido condrogénico mejor en los biomateriales de Col I +3%HS y Col I +Col II +HS.

1.3. Las CMEs-MO humanas cultivadas sobre soportes de Col I +Col II +HS presentan mayor reparación que sobre el resto de biomateriales, en lesiones de cartílago articular humano, en un modelo *in vitro*.

1.4. La presencia de IL1 $\beta$  en las lesiones de cartílago articular humano disminuyen la capacidad de reparación de las CMEs y el fenotipo condrogénico de los constructos.

**2. Las CMEs obtenidas de MO ovina son útiles para el estudio *in vitro* de la Ingeniería del cartílago y el hueso.**

2.1. Las CMEs aisladas de la MO ovina tienen capacidad de diferenciación multipotente.

2.2. Las oCMEs-MO son capaces de diferenciarse osteogénicamente y de formar un neot Tejido osteogénico sobre biomateriales de Col I, pero no sobre soportes de  $\beta$ -FTC.

2.3. Las oCMEs-MO cultivadas sobre soportes de Col I son capaces de reparar lesiones de cartílago articular ovino, en un modelo *in vitro*.

**3. Las CSMEs, generadas a partir de *iPS*, son útiles en la Ingeniería del cartílago y hueso.**

3.1. Las células aisladas de los EBs formados por *iPS* son similares a CMEs, sin embargo no presentan capacidad de diferenciación adipogénica.

**3.2.** Las C-CSMEs tienen mayor capacidad de diferenciación condrogénica que las NC-CSMEs y las NC-CSMEs mayor capacidad osteogénica que las C-CSMEs.

## CONCLUSIONS

---



## 1. Human *CMEs-MO* are useful for cartilage Engineering.

1.1. *CMEs* isolated from human bone marrow have multipotent differentiation capacity.

1.2. Among all tested scaffolds, human *CMEs-MO* show the best chondrogenic neotissue when grown on Col I +3%HS and Col I +Col II +HS scaffolds.

1.3. Human *CMEs-MO*, cultured on Col I +Col II +HS scaffolds, display better human cartilage lesions repair than on the other scaffolds, in an *in vitro* model.

1.4. On human cartilage lesions IL1 $\beta$  decrease the *CMEs* repair capacity and the chondrogenic phenotype of the constructs.

## 2. *CMEs* isolated from ovine bone marrow are useful to perform cartilage and bone Engineering studies.

2.1. *oCMEs* isolated from ovine bone marrow aspirates have multipotent differentiation capacity.

2.2. *oCMEs* are capable to undergo osteogenic differentiation and to form an osteogenic neotissue when grown on Col I but not on  $\beta$ -FTC scaffolds.

2.3. *oCMEs*, cultured on Col I scaffolds, are able to repair ovine cartilage lesions, in an *in vitro* model.

## 3. *CSMEs* derived from iPS are useful for the cartilage and bone Engineering.

3.1. Cells isolated from the EBs formed by iPS are similar to *CMEs* but they do not show adipogenic differentiation capacity.

3.2. Pseudoclonal mesenchymal like cells (*C-CSMEs*) exhibit higher chondrogenic differentiation capacity than non-clonal mesenchymal like cells (*NC-CSMEs*) and *NC-CSMEs* higher osteogenic capacity than *C-CSMEs*.





## BIBLIOGRAFÍA

---



1. ABRAHAMSSON, C. K. y col. *Chondrogenesis and Mineralization During In Vitro Culture of Human Mesenchymal Stem Cells on Three-Dimensional Woven Scaffolds*. Tissue Engineering Part A, v. 16, n. 12, p. 3709-3718, Dec 2010.
2. ADAMZYK, C. y col. *Different Culture Media Affect Proliferation, Surface Epitope Expression, and Differentiation of Ovine MSC*. Stem cells international, v. 2013, p. 387324-387324, 2013.
3. AL FAQEH, H. y col. *The potential of intra-articular injection of chondrogenic-induced bone marrow stem cells to retard the progression of osteoarthritis in a sheep model*. Experimental Gerontology, v. 47, n. 6, Jun 2012.
4. ALMAZÁN, A. y col. *Arthroscopic treatment for osteoarthritis: knee and shoulder*. Reumatologia clinica, v. 3, Suppl 3, p. S44-S49, Oct 2007.
5. ÁLVAREZ, C. V. y col. *Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells*. Journal of Molecular Endocrinology, v. 49, n. 2, p. R89-R111, Oct 2012.
6. ARUFE, M. C. y col. *Chondrogenic Potential of Subpopulations of Cells Expressing Mesenchymal Stem Cell Markers Derived From Human Synovial Membranes*. Journal of Cellular Biochemistry, v. 111, n. 4, p. 834-845, Nov 2010.
7. ATAYDE, L. M. y col. *A new sheep model with automatized analysis of biomaterial-induced bone tissue regeneration*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, v. 25, n. 8, p. 1885-1901, Aug 2014.
8. BAINO, F.; NOVAJRA, G.; VITALE-BROVARONE, C. *Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, v. 3, p. 202-202, 2015.
9. BARBERI, T. y col. *Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells*. Plos Medicine, v. 2, n. 6, p. 554-560, Jun 2005.

10. BENTHIEN, J. P.; BEHRENS, P. *The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments*. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, v. 19, n. 8, p. 1316-1319, Aug 2011.
11. BHOSALE, A. M.; RICHARDSON, J. B. *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. British Medical Bulletin, v. 87, n. 1, p. 77-95, Sep 2008.
12. BIAN, L. y col. *Coculture of Human Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes Reduces Hypertrophy and Enhances Functional Properties of Engineered Cartilage*. Tissue Engineering Part A, v. 17, n. 7-8, p. 1137-1145, Apr 2011.
13. BLANCO GARCÍA, F. J. *Aspectos básicos*. cap. I. En: BATLLE-GUALDA, E.; BENITO RUIZ, P. y col. *Manual SER de la artrosis*. 1 Ed. Madrid: IM&C, 2002.
14. BLANCO GARCÍA, F. J.; TORNERO MOLINA, J. *Artrosis*. cap. 112. En: FARRERAS, P. e ROZMAN, C. *Medicina Interna*. 18 Ed. Barcelona: Elsevier, v.I, 2016.
15. BOOS, A. M. y col. *Directly auto-transplanted mesenchymal stem cells induce bone formation in a ceramic bone substitute in an ectopic sheep model*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, v. 15, n. 6, Jun 2011.
16. BOSNAKOVSKI, D. y col. *Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis*. Biotechnology and Bioengineering, v. 93, n. 6, p. 1152-1163, Apr 2006.
17. BOXALL, S. A.; JONES, E. *Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells*. Stem Cells. v. 2012, 2012.
18. BRITTBERG, M.; PETERSON, L. *Introduction to an articular cartilage classification*. International Cartilage Repair Society Newsletter, v. 1, p. 5-8, 1998.

19. BROOKS, P. M. *Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications.* Current Opinion in Rheumatology, v. 14, n. 5, p. 573-577, Sep 2002.
20. CASTAÑEDA SANZ, S.; HERRERO-BEAUMONT, G. *El hueso subcondral y el tejido sinovial como diana terapéutica en la artrosis.* Revista Española de Reumatología, v. 32, n. 1, p. 42-47, 2005.
21. CASTIELLA-MURUZÁBAL, S. y col. *Artroplastia de rodilla.* Rehabilitación, v. 41, n. 6, p. 290-308, 2007.
22. CAVALLO, C. y col. *Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hylauronan scaffold: Rationale for its use in the treatment of cartilage lesions.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 101, n. 6, p. 1559-1570, Nov 2012.
23. CHAN, B. P.; LEONG, K. W. *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations.* European Spine Journal, v. 17, n. Suppl 4, p. S467-S479, Dec 2008.
24. CHEN, C. W. y col. *Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells.* Journal of Orthopaedic Research, v. 23, n. 2, p. 446-453, Mar 2005.
25. CHEN, F. H.; TUAN, R. S. *Mesenchymal stem cells in arthritic diseases.* Arthritis Research & Therapy, v. 10, n. 5, 2008.
26. CHEN, S. y col. *Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration.* Genes Dis, v. 2, n. 1, p. 76-95, Mar 2015.
27. CHEN, W. C. y col. *Evaluating osteochondral defect repair potential of autologous rabbit bone marrow cells on type II collagen scaffold.* Cytotechnology, v. 63, n. 1, p. 13-23, Jan 2011.
28. CHEVRIER, A. y col. *Interspecies comparison of subchondral bone properties important for cartilage repair.* Journal of Orthopaedic Research, v. 33, n. 1, p. 63-70, Jan 2015.

- 29.** CHIANG, H. y col. *Differences Between Chondrocytes and Bone Marrow-Derived Chondrogenic Cells*. Tissue Engineering Part A, v. 17, n. 23-24, p. 2919-2929, Dec 2011.
- 30.** CHIANG, H.; JIANG, C.-C. *Repair of Articular Cartilage Defects: Review and Perspectives*. Journal of the Formosan Medical Association, v. 108, n. 2, p. 87-101, Feb 2009.
- 31.** CICIONE, C. y col. *Effects of severe hypoxia on bone marrow mesenchymal stem cells differentiation potential*. Stem cells international, v. 2013, p. 232896-232896, 2013.
- 32.** CLAUS, S. y col. *Cartilage-Characteristic Matrix Reconstruction by Sequential Addition of Soluble Factors During Expansion of Human Articular Chondrocytes and Their Cultivation in Collagen Sponges*. Tissue Engineering Part C-Methods, v. 18, n. 2, p. 104-112, Feb 2012.
- 33.** COCHRAN, D. L. y col. *A Randomized Clinical Trial Evaluating rh-FGF-2/ $\beta$ -TCP in Periodontal Defects*. Journal of Dental Research, v. 95, n. 5, p. 523-30, May 2016.
- 34.** COOKE, M. E. y col. *Structured three-dimensional co-culture of mesenchymal stem cells with chondrocytes promotes chondrogenic differentiation without hypertrophy*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 19, n. 10, p. 1210-1218, Oct 2011.
- 35.** COSTA, H. J. Z. R. y col. *Comparison of butyl-2-cyanoacrylate, gelatin-resorcin-formaldehyde (GRF) compound and suture in stabilization of cartilage grafts in rabbits*. Brazilian journal of otorhinolaryngology, v. 72, n. 1, p. 61-71, 2006.
- 36.** CYRANOSKI, D. *Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells*. Nature. International weekly journal of science: Nature 2014.
- 37.** DANIŠOVIČ, L. y col. *Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Journal of applied Biomedicine, v. 5, p. 139-150, 2007.

- 38.** DE FRANCESCHI, L. y col. *Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 75, n. 3, p. 612-622, Dec 2005.
- 39.** DE VRIES-VAN MELLE, M. L. y col. *An Osteochondral Culture Model to Study Mechanisms Involved in Articular Cartilage Repair*. Tissue Engineering Part C-Methods, v. 18, n. 1, p. 45-53, Jan 2012.
- 40.** DEMOOR, M. y col. *Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, v. 1840, n. 8, p. 2414-2440, Aug 2014.
- 41.** DENG, Z. y col. *Cartilage Defect Treatments: With or without Cells? Mesenchymal Stem Cells or Chondrocytes? Traditional or Matrix-Assisted? A Systematic Review and Meta-Analyses*. Stem Cells International, v. 2016, 2016.
- 42.** DESANTIS, S. y col. *Ultrastructural study of cultured ovine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, v. 201, p. 43-49, 2015.
- 43.** DEWAN, A. K. y col. *Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques*. BioMed research international, v. 2014, p. 272481-272481, 2014.
- 44.** DHOLLANDER, A. A. M. y col. *The use of scaffolds in the treatment of osteochondral lesions in the knee: current concepts and future trends*. The journal of knee surgery, v. 25, n. 3, p. 179-86, Jul 2012.
- 45.** DIAZ-PRADO, S. y col. *Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine*. Differentiation, v. 81, n. 3, p. 162-171, Mar 2011.
- 46.** DOMINICI, M. y col. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, v. 8, n. 4, p. 315-317, Aug 2006.

47. EL-JAWHARI, J. J. y col. *Collagen-containing scaffolds enhance attachment and proliferation of non-cultured bone marrow multipotential stromal cells*. Journal of Orthopaedic Research, Oct 2015.
48. ENDRES, M. y col. *An ovine in vitro model for chondrocyte-based scaffold-assisted cartilage grafts*. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, v. 7, Nov 2012.
49. FACCHINI, A. y col. *Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold*. Biorheology, v. 43, n. 3-4, p. 471-480, 2006.
50. FAN, J. y col. *Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration*. Tissue Engineering Part B-Reviews, v. 15, n. 1, p. 75-86, Mar 2009.
51. FILARDO, G. y col. *Scaffold-Based Repair for Cartilage Healing: A Systematic Review and Technical Note*. Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery, v. 29, n. 1, p. 174-186, Jan 2013.
52. FROBEL, J. y col. *Epigenetic Rejuvenation of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells*. Stem Cell Reports, v. 3, n. 3, p. 414-422, Sep 2014.
53. FUENTES-BOQUETE, I. M. y col. *Cell and Tissue Transplant Strategies for Joint Lesions*. The Open Transplantation Journal, v. 2, p. 21-28, 2008.
54. FUENTES-BOQUETE, I. M. y col. *Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular*. Reumatología Clínica, v. 3, p. S63-9, 2007.
55. GIANAKOS, A. y col. *Bone Marrow Aspirate Concentrate in Animal Long Bone Healing: An Analysis of Basic Science Evidence*. Journal of Orthopaedic Trauma, v. 30, n. 1, p. 1-9, Jan 2016.
56. GIANNOBILE, W.; RÍOS, H. F.; LANG, N. P. *El hueso como tejido*. cap. 4. En: LINDHE, J.; LANG, N. P., y col. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. 5 Ed. Madrid: Editorial médica panamericana, 2008.



- 57.** GIANNOUDIS, P. V. y col. *Inflammation, Bone Healing, and Anti-Inflammatory Drugs: An Update*. Journal of orthopaedic trauma, v. 29 Suppl 12, p. S6-9, Dec 2015
- 58.** GLORIA, A.; DE SANTIS, R.; AMBROSIO, L. *Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering*. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics, v. 8, n. 2, p. 57-67, May-Aug 2010.
- 59.** GOMEZ-BARRENA, E. y col. *Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, v. 15, n. 6, p. 1266-1286, Jun 2011.
- 60.** GOMOLL, A. H. y col. *The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management*. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, v. 18, n. 4, p. 434-447, Apr 2010.
- 61.** GOMOLL, A. H.; MINAS, T. *The quality of healing: Articular cartilage*. Wound Repair and Regeneration, v. 22, p. 30-38, May 2014.
- 62.** GREGORY, C. A. y col. *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. Analytical Biochemistry, v. 329, n. 1, p. 77-84, Jun 2004.
- 63.** GRIGOLO, B. y col. *Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF (R) 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis*. Biomaterials, v. 23, n. 4, p. 1187-1195, Feb 2002a.
- 64.** GRIGOLO, B. y col. *Human articular chondrocytes immortalized by HPV-16 E6 and E7 genes: Maintenance of differentiated phenotype under defined culture conditions*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 10, n. 11, p. 879-889, Nov 2002b.
- 65.** GROGAN, S. P. y col. *Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity*. Arthritis and Rheumatism, v. 56, n. 2, p. 586-595, Feb 2007.

- 66.** GUZZO, R. M. y col. *Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells*. Journal of Cellular Biochemistry, v. 114, n. 2, p. 480-490, Feb 2013.
- 67.** HARRINGTON, E. K.; LUNSFORD, L. E.; SVOBODA, K. K. H. *Chondrocyte terminal differentiation, apoptosis, and type X collagen expression are downregulated by parathyroid hormone*. Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology, v. 281A, n. 2, p. 1286-1295, Dec 2004.
- 68.** HE, X.; WANG, Y.; WU, G. *Layer-by-layer assembly of type I collagen and chondroitin sulfate on aminolyzed PU for potential cartilage tissue engineering application*. Applied Surface Science, v. 258, n. 24, p. 9918-9925, Oct 2012.
- 69.** HELLINGMAN, C. A.; KOEVOET, W.; VAN OSCH, G. *Can one generate stable hyaline cartilage from adult mesenchymal stem cells? A developmental approach*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 6, n. 10, p. e1-e11, Nov 2012.
- 70.** HERMIDA GÓMEZ, T. *Estudio descriptivo de las células madre mesenquimales en la articulación artrósica y su aplicación en terapia celular para reparar cartílago articular humano*. 2010. Medicina, Universidade da Coruña, A Coruña.
- 71.** HERMIDA-GÓMEZ, T. y col. *Bone Marrow Cells Immunomagnetically Selected For CD271+Antigen Promote In Vitro the Repair of Articular Cartilage Defects*. Tissue Engineering Part A, v. 17, n. 7-8, p. 1169-1179, Apr 2011.
- 72.** HUBER, F.-X. y col. *First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste OSTIM (R) in human cancellous bone*. BMC Musculoskeletal Disorders, v. 7, Jun 2006.
- 73.** HUNZIKER, E. B. *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 10, n. 6, p. 432-463, Jun 2002.

- 74.** HWANG, N. S. y col. *Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived cells in arginine-glycine-aspartate modified hydrogels*. Tissue Engineering, v. 12, n. 9, p. 2695-2706, Sep 2006.
- 75.** INUI, A.; IWAKURA, T.; REDDI, A. H. *Human stem cells and articular cartilage regeneration*. Cells, v. 1, n. 4, p. 994-1009, Nov 2012.
- 76.** JIANG, C. C. y col. *Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite*. Journal of Orthopaedic Research, v. 25, n. 10, p. 1277-1290, Oct 2007.
- 77.** JIANG, Y. y col. *The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism*. Science, v. 344, n. 6188, p. 1168-1173, Jun 2014.
- 78.** JIMÉNEZ-CASTELLANOS BALLESTEROS, J.; CATALINA HERRERA, C. J.; CARMONA BONO, A. *Anatomía humana general*. 1 Ed. Sevilla: Secretariado de publicaciones, 2007.
- 79.** JIN, C. Z. y col. *In vivo cartilage tissue engineering using a cell-derived extracellular matrix scaffold*. Artificial Organs, v. 31, n. 3, p. 183-192, Mar 2007.
- 80.** JOHNSTONE, B. y col. *Tissue Engineering for articular cartilage repair-the state of the art*. European Cells & Materials, v. 25, p. 248-267, Jan-Jun 2013.
- 81.** JOHNSTONE, B. y col. *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Experimental Cell Research, v. 238, n. 1, p. 265-272, Jan 1998.
- 82.** JONES, E.; MCGONAGLE, D. *Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo*. Rheumatology, v. 47, n. 2, p. 126-131, Feb 2008.
- 83.** JONES, E. A. y col. *Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells*. Arthritis and Rheumatism, v. 46, n. 12, p. 3349-3360, Dec 2002.

- 84.** JOSE MARTINEZ-LORENZO, M. y col. *Phenotype and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Cells from Adipose Tissue of Different Species*. Journal of Orthopaedic Research, v. 27, n. 11, Nov 2009.
- 85.** KAGITA, E. y col. *Effect of Monosaccharides Composing Glycosaminoglycans on Type 2 Collagen Accumulation in a Three-Dimensional Culture of Chondrocytes*. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 109, n. 1, p. 51-54, Jan 2010.
- 86.** KEOGH, M. B.; O'BRIEN, F. J.; DALY, J. S. *A novel collagen scaffold supports human osteogenesis-applications for bone tissue engineering*. Cell and Tissue Research, v. 340, n. 1, p. 169-177, Apr 2010.
- 87.** KHAN, I. M. y col. *Interleukin-1 $\beta$  enhances cartilage-to-cartilage integration*. European cells & materials, v. 22, Nov 2011.
- 88.** KHOSHGOFTAR, M.; VAN DONKELAAR, C. C.; ITO, K. *Mechanical stimulation to stimulate formation of a physiological collagen architecture in tissue-engineered cartilage: a numerical study*. Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, v. 14, n. 2, p. 135-144, 2011.
- 89.** KIM, Y. J.; KIM, H. J.; IM, G. I. *PTHrP promotes chondrogenesis and suppresses hypertrophy from both bone marrow-derived and adipose tissue-derived MSCs*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 373, n. 1, p. 104-108, Aug 2008.
- 90.** KIRN-SAFRAN, C. B. y col. *Heparan sulfate proteoglycans: coordinators of multiple signaling pathways during chondrogenesis*. Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews, v. 72, n. 1, p. 69-88, Mar 2004.
- 91.** KOCK, L.; VAN DONKELAAR, C. C.; ITO, K. *Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status*. Cell and Tissue Research, v. 347, n. 3, p. 613-627, Mar 2012.
- 92.** KOHLI, N. y col. *An In Vitro Comparison of the Incorporation, Growth, and Chondrogenic Potential of Human Bone Marrow versus Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells in Clinically Relevant Cell Scaffolds Used for Cartilage Repair*. Cartilage, v. 6, n. 4, p. 252-263, Oct 2015.

- 93.** KOYAMA, N. y col. *Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiated into Chondrogenic Lineage Via Generation of Mesenchymal Progenitor Cells*. Stem Cells and Development, v. 22, n. 1, p. 102-113, Jan 2013.
- 94.** KRAUS, V. B. y col. *Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use*. Osteoarthritis Cartilage, Apr 2015.
- 95.** KUO, C. K. y col. *Cartilage tissue engineering: its potential and uses*. Current Opinion in Rheumatology, v. 18, n. 1, p. 64-73, Jan 2006.
- 96.** LEE, C.-T.; HUANG, C.-P.; LEE, Y.-D. *Biomimetic porous scaffolds made from poly(L-lactide)-g-chondroitin sulfate blend with poly(L-lactide) for cartilage tissue engineering*. Biomacromolecules, v. 7, n. 7, p. 2200-2209, Jul 2006.
- 97.** LEE, J.-M.; IM, G.-I. *PTHrP isoforms have differing effect on chondrogenic differentiation and hypertrophy of mesenchymal stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 421, n. 4, p. 819-824, May 2012.
- 98.** LIAO, C. J. y col. *Injecting partially digested cartilage fragments into a biphasic scaffold to generate osteochondral composites in a nude mice model*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 81A, n. 3, p. 567-577, Jun 2007.
- 99.** LIAO, J. y col. *Recent Developments in Scaffold-Guided Cartilage Tissue Regeneration*. Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 10, n. 10, p. 3085-3104, Oct 2014.
- 100.** LINDROOS, B. y col. *Differential Gene Expression in Adipose Stem Cells Cultured in Allogeneic Human Serum Versus Fetal Bovine Serum*. Tissue Engineering Part A, v. 16, n. 7, p. 2281-2294, Jul 2010.
- 101.** LISIGNOLI, G. y col. *Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold*. Biomaterials, v. 26, n. 28, p. 5679-5686, Oct 2005.

- 102.** LIU, J. y col. *The Effect of 3D Nanofibrous Scaffolds on the Chondrogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells and Their Application in Restoration of Cartilage Defects*. Plos One, v. 9, n. 11, Nov 2014.
- 103.** LIU, Y. y col. *One-Step Derivation of Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Like Cells from Human Pluripotent Stem Cells on a Fibrillar Collagen Coating*. Plos One, v. 7, n. 3, Mar 2012.
- 104.** LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method*. Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.
- 105.** LOPEZ-RUIZ, E. y col. *Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 21, n. 1, p. 246-258, Jan 2013.
- 106.** LOU, X. *Induced Pluripotent Stem Cells as a new Strategy for Osteogenesis and Bone Regeneration*. Stem Cell Reviews and Reports, v. 11, n. 4, p. 645-651, Aug 2015.
- 107.** LUTIANOV, M. y col. *A mathematical model of cartilage regeneration after cell therapy*. Journal of Theoretical Biology, v. 289, p. 136-150, Nov 2011.
- 108.** LYAHYAI, J. y col. *Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood*. BMC Veterinary Research, v. 8, Sep 2012.
- 109.** MADRY, H.; VAN DIJK, C. N.; MUELLER-GERBL, M. *The basic science of the subchondral bone*. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, v. 18, n. 4, p. 419-433, Apr 2010.
- 110.** MAHMOUDIFAR, N.; DORAN, P. M. *Extent of Cell Differentiation and Capacity for Cartilage Synthesis in Human Adult Adipose-Derived Stem Cells: Comparison with Fetal Chondrocytes*. Biotechnology and Bioengineering, v. 107, n. 2, p. 393-401, Oct 1 2010.

- 111.** MAINIL-VARLET, P. y col. *A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II*. American Journal of Sports Medicine, v. 38, n. 5, p. 880-890, May 2010.
- 112.** MANKIN, H. J. y col. *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume, v. A 53, n. 3, p. 523, 1971.
- 113.** MAO, J. J. *Stem-cell-driven regeneration of synovial joints*. Biology of the Cell, v. 97, n. 5, p. 289-301, May 2005.
- 114.** MARKWAY, B. D. y col. *Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Low Oxygen Environment Micropellet Cultures*. Cell Transplantation, v. 19, n. 1, p. 29-42, 2010 2010.
- 115.** MAYAN, M. D. y col. *Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis*. Annals of the Rheumatic Diseases, Nov 2013.
- 116.** MCCARTY, R. C. y col. *Characterisation and Developmental Potential of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells*. Journal of Cellular Physiology, v. 219, n. 2, p. 324-333, May 2009.
- 117.** MEDVEDEV, S. P. y col. *Human Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Fetal Neural Stem Cells Successfully Undergo Directed Differentiation into Cartilage*. Stem Cells and Development, v. 20, n. 6, p. 1099-1112, Jun 2011.
- 118.** MERETOJA, V. V. y col. *The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds*. Biomaterials, v. 34, n. 17, p. 4266-4273, Jun 2013.
- 119.** MERÍ, A. Fundamentos de fisiología de la actividad física y el deporte. 1 Ed. Madrid: Editorial médica panamericana, 2005.

- 120.** MESALLATI, T. y col. *Tissue engineering scaled-up, anatomically accurate osteochondral constructs for joint resurfacing*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 8, p. 152-153, Jun 2014.
- 121.** MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. *Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications*. Ageing Research Reviews, v. 8, n. 2, p. 94-112, Apr 2009.
- 122.** MIZUTA, H. y col. *Expression of the PTH/PTHrP receptor in chondrogenic cells during the repair of full-thickness defects of articular cartilage*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 14, n. 9, p. 944-952, Sep 2006.
- 123.** MOBASHERI, A. y col. *Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions*. Maturitas, v. 78, n. 3, p. 188-198, Jul 2014.
- 124.** MOORE, K. L.; AGUR, A. M. R. *Fundamentos de anatomía con orientación clínica*. 2 Ed. Buenos Aires: Editorial médica panamericana, 2003.
- 125.** MOUW, J. K. y col. *Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 13, n. 9, p. 828-836, Sep 2005.
- 126.** MRUGALA, D. y col. *Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model*. Annals of the Rheumatic Diseases, v. 67, n. 3, Mar 2008.
- 127.** MUSUMECI, G. y col. *Histochemistry as a unique approach for investigating normal and osteoarthritic cartilage*. European Journal of Histochemistry, v. 58, n. 2, p. 107-111, 2014.
- 128.** MWALE, F. y col. *Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation*. Journal of Orthopaedic Research, v. 24, n. 8, p. 1791-1798, Aug 2006.



- 129.** NARCISI, R. y col. *Long-Term Expansion, Enhanced Chondrogenic Potential, and Suppression of Endochondral Ossification of Adult Human MSCs via WNT Signaling Modulation*. Stem Cell Reports, v. 4, n. 3, p. 459-472, Mar 2015.
- 130.** NEGRI, S. y col. *Tissue engineering: chondrocyte culture on type 1 collagen support. Cytohistological and immunohistochemical study*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 1, n. 2, p. 57-63, Mar-Apr 2007.
- 131.** NEWMAN, A. P. *Articular cartilage repair*. American Journal of Sports Medicine, v. 26, n. 2, p. 309-324, Mar-Apr 1998.
- 132.** NIEMEYER, P. y col. *Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma*. Biomaterials, v. 31, n. 13, May 2010.
- 133.** NIKNEJAD, H. y col. *Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering*. European Cells & Materials, v. 15, p. 88-99, Jan-Jun 2008.
- 134.** ODRISCOLL, S. W.; KEELEY, F. W.; SALTER, R. B. *The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion – an experimental investigation in the rabbit*. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume, v. 68A, n. 7, p. 1017-1035, Sep 1986.
- 135.** OLDERSHAW, R. A. y col. *Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes*. Nature Biotechnology, v. 28, n. 11, p. 1221-U80, Nov 2010.
- 136.** OLSEN, A. K. y col. *Anabolic and catabolic function of chondrocyte ex vivo is reflected by the metabolic processing of type II collagen*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 15, n. 3, p. 335-342, Mar 2007.

- 137.** OZEN, A. y col. *Ultrastructural Characteristics of Sheep and Horse Mesenchymal Stem Cells*. Microscopy Research, v. 1, p. 17-23, 2013.
- 138.** PABBRUWE, M. B. y col. *Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant*. Biomaterials, v. 30, n. 26, p. 4277-4286, Sep 2009.
- 139.** PANADERO, J. A.; LANCEROS-MENDEZ, S.; GOMEZ RIBELLES, J. L. *Differentiation of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: Individual and synergetic effects of three-dimensional environment and mechanical loading*. Acta Biomaterialia, v. 33, p. 1-12, Mar 2016.
- 140.** PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. *Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Materials, v. 3, n. 3, p. 1863-1887, Mar 2010.
- 141.** PASCHOS, N. K. y col. *Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 9, n. 5, p. 488-503, May 2015.
- 142.** PEARCE, A. I. y col. *Animal models for implant biomaterial research in bone: A review*. European Cells & Materials, v. 13, p. 1-10, Jan-Jun 2007.
- 143.** PERDIKOURI, C.; TAGIL, M.; ISAKSSON, H. *Characterizing the Composition of Bone Formed During Fracture Healing Using Scanning Electron Microscopy Techniques*. Calcified Tissue International, v. 96, n. 1, p. 11-17, Jan 2015.
- 144.** PIEPER, J. S. y col. *Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats*. Biomaterials, v. 21, n. 16, p. 1689-1699, Aug 2000.
- 145.** PINEDA, S. y col. *A semiquantitative scale for histologic grading of articular-cartilage repair*. Acta Anatomica, v. 143, n. 4, p. 335-340, Apr 1992.
- 146.** PITTENGER, M. F. y col. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, v. 284, n. 5411, p. 143-147, Apr 1999.

- 147.** POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. *Scaffold Design for Bone Regeneration*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 14, n. 1, p. 15-56, Jan 2014.
- 148.** POOLE, C. A.; FLINT, M. H.; BEAUMONT, B. W. *Chondrons in cartilage- Ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages*. Journal of Orthopaedic Research, v. 5, n. 4, p. 509-522, 1987.
- 149.** RACKWITZ, L. y col. *Functional cartilage repair capacity of de-differentiated, chondrocyte- and mesenchymal stem cell-laden hydrogels in vitro*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 22, n. 8, p. 1148-1157, Aug 2014.
- 150.** RAGETLY, G. R. y col. *Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis*. Acta Biomaterialia, v. 6, n. 4, p. 1430-1436, Apr 2010.
- 151.** RAGHUNATH, J. y col. *Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology*. Current Opinion in Biotechnology, v. 16, n. 5, p. 503-509, Oct 2005.
- 152.** REICHERT, J. C. y col. *Ovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 4, n. 7, Oct 2010.
- 153.** RENTSCH, C. y col. *Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, v. 46, n. 7, p. 624-634, Jul 2010.
- 154.** RICHLER, C.; YAFFE, D. *In-vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines*. Developmental Biology, v. 23, n. 1, p. 1-22, 1970.

- 155.** ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Histología. Texto y atlas en color con biología celular y molecular*. 5 Ed. Madrid: Editorial médica panamericana, 2007.
- 156.** ROSSET, P.; DESCHASEAUX, F.; LAYROLLE, P. *Cell therapy for bone repair*. Orthopaedics & Traumatology-Surgery & Research, v. 100, n. 1, p. S107-S112, Feb 2014.
- 157.** ROZEMULLER, H. y col. *Prospective Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Mammalian Species Using Cross-Reacting Anti-Human Monoclonal Antibodies*. Stem Cells and Development, v. 19, n. 12, Dec 2010.
- 158.** RUTGERS, M. y col. *Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 18, n. 1, p. 12-23, Jan 2010.
- 159.** SCHAGEMANN, J. C. y col. *Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells via biomimetic and bioactive poly-epsilon-caprolactone scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 101, n. 6, p. 1620-1628, Jun 2013.
- 160.** SCHMITT, S. y col. *Comparative in vitro study of the proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic biomaterials manufactured for augmentation and reconstruction of tissue or bone defects*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 19, n. 3, p. 1441-50, 2008.
- 161.** SCHNEIDER, G. *Tissue adhesives in otorhinolaryngology*. GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery, v. 8, p. Doc01-Doc01, 2009.
- 162.** SCHULZ, R. M. y col. *Cartilage tissue engineering by collagen matrix associated bone marrow derived mesenchymal stem cells*. Bio-Medical Materials and Engineering, v. 18, 2008, 2008.
- 163.** SCOTTI, C. y col. *Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair*. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, v. 18, n. 10, p. 1400-1406, Oct 2010.

- 164.** SEEBACH, C. y col. *Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro*. Injury-International Journal of the Care of the Injured, v. 41, n. 7, p. 731-738, Jul 2010.
- 165.** SEO, S.; NA, K. *Mesenchymal Stem Cell-Based Tissue Engineering for Chondrogenesis*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, p. 8, 2011.
- 166.** SHARMA, S. y col. *Biomaterials in tooth tissue engineering: a review*. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, v. 8, n. 1, p. 309-15, 2014-Jan 2014.
- 167.** SOMERS, P. y col. *An optimized growth factor cocktail for ovine mesenchymal stem cells*. Growth Factors, v. 30, n. 1, p. 37-48, Feb 2012.
- 168.** SONG, F. y col. *Comparison of the efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, v. 7, n. 4, p. 1415-1426, 2014.
- 169.** SOPHIA FOX, A. J.; BEDI, A.; RODEO, S. A. *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports health, v. 1, n. 6, p. 461-8, Nov 2009.
- 170.** STEINICHE, T.; HAUGE, E. M. *Normal structure and function of bone*. cap. 3, p.59-72. En: AN, Y. H. e MARTIN, K. L. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. New York: Springer Science+Business Media LLC, 2003.
- 171.** SUAREZ-GONZALEZ, D. y col. *Controlled Multiple Growth Factor Delivery from Bone Tissue Engineering Scaffolds via Designed Affinity*. Tissue Engineering Part A, v. 20, n. 15-16, p. 2077-2087, Aug 2014.
- 172.** TAKAHASHI, K. y col. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, v. 131, n. 5, p. 861-872, Nov 30 2007.

- 173.** TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, v. 126, n. 4, p. 663-676, Aug 2006.
- 174.** TARABALLI, F. y col. *Biomimetic collagenous scaffold to tune inflammation by targeting macrophages*. Journal of tissue engineering, v. 7, p. 2041731415624667-2041731415624667, 2016.
- 175.** TEDDER, M. E. y col. *Stabilized Collagen Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering*. Tissue Engineering Part A, v. 15, n. 6, p. 1257-1268, Jun 2009.
- 176.** TEW, S. R. y col. *Cellular methods in cartilage research: Primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells*. Methods, v. 45, n. 1, p. 2-9, May 2008.
- 177.** TOH, W. S. y col. *Advances in Mesenchymal Stem Cell-based Strategies for Cartilage Repair and Regeneration*. Stem Cell Reviews and Reports, v. 10, n. 5, p. 686-696, Oct 2014
- 178.** TOH, W. S. y col. *Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells*. Biomaterials, v. 31, n. 27, p. 6968-6980, Sep 2010.
- 179.** TORTELLI, F.; CANCEDDA, R. *Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage in vitro*. European Cells & Materials, v. 17, p. 1-14, Jan-Jun 2009.
- 180.** TRITZ-SCHIAVI, J. y col. *Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells*. Bio-Medical Materials and Engineering, v. 20, n. 3-4, p. 167-174, 2010.
- 181.** TULI, R.; LI, W. J.; TUAN, R. S. *Current state of cartilage tissue engineering*. Arthritis Research & Therapy, v. 5, n. 5, p. 235-238, 2003.

- 182.** UDE, C. C. y col. *Cartilage Regeneration by Chondrogenic Induced Adult Stem Cells in Osteoarthritic Sheep Model*. Plos One, v. 9, n. 6, Jun 2014.
- 183.** VALDERRABANO, V. y col. *Knee-to-Ankle Mosaicplasty for the Treatment of Osteochondral Lesions of the Ankle Joint*. American Journal of Sports Medicine, v. 37, p. 105S-111S, Nov 2009.
- 184.** VAN DEN BORNE, M. P. J. y col. *International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 15, n. 12, p. 1397-1402, Dec 2007.
- 185.** VARGHESE, S. y col. *Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Matrix Biology, v. 27, n. 1, p. 12-21, Jan 2008.
- 186.** VILA Y RICO, J. y col. *Treatment of Osteochondral Lesions of the Talus With Bone Marrow Stimulation and Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants (BST-CarGel)*. Arthroscopy techniques, v. 4, n. 6, p. e663-7, Dec 2015.
- 187.** VILLA-DIAZ, L. G. y col. *Derivation of Mesenchymal Stem Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells Cultured on Synthetic Substrates*. Stem Cells, v. 30, n. 6, p. 1174-1181, Jun 2012.
- 188.** VINATIER, C. y col. *Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors*. Trends in Biotechnology, v. 27, n. 5, p. 307-314, May 2009.
- 189.** WAGNER, W. y col. *Aging and Replicative Senescence Have Related Effects on Human Stem and Progenitor Cells*. Plos One, v. 4, n. 6, Jun 2009.
- 190.** WALSH, W. R. y col. *Cell structure and biology of bone and cartilage*. cap. 2, p.35-58. En: AN, Y. H. e MARTIN, K. L. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. New York: Springer Science+Business Media LLC, 2003.

- 191.** WANG, C. y col. *Physical Properties and Biocompatibility of a Core-Sheath Structure Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering In Vitro*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012: 1-9 p. 2012.
- 192.** WANG, D.; TABOAS, J. M.; TUAN, R. S. *PTHrP overexpression partially inhibits a mechanical strain-induced arthritic phenotype in chondrocytes*. Osteoarthritis and Cartilage, v. 19, n. 2, p. 213-221, Feb 2011.
- 193.** WANG, L. y col. *A Comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering*. Tissue Engineering Part A, v. 15, n. 8, p. 2259-2266, Aug 2009.
- 194.** WEI, Y. y col. *Chondrogenic differentiation of induced pluripotent stem cells from osteoarthritic chondrocytes in alginate matrix*. European Cells & Materials, v. 23, p. 1-12, Jan-Jun 2012.
- 195.** WEISS, S. y col. *Impact of Growth Factors and PTHrP on Early and Late Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells*. Journal of Cellular Physiology, v. 223, n. 1, p. 84-93, Apr 2010.
- 196.** WOLBANK, S. y col. *Alternative Sources of Adult Stem Cells: Human Amniotic Membrane*. Bioreactor Systems for Tissue Engineering II: Strategies for the Expansion and Directed Differentiation of Stem Cells, v. 123, p. 1-27, 2010.
- 197.** WONG, C. C. y col. *Phenotypic re-expression of near quiescent chondrocytes: The effects of type II collagen and growth factors*. J Biomater Appl, v. 25, n. 1, p. 75-95, Jul 2010.
- 198.** WYLES, C. C. y col. *Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives*. Stem cells and cloning: advances and applications, v. 8, p. 117-24, 2015.
- 199.** XU, C. y col. *Porous Collagen Scaffold Reinforced with Surfaced Activated PLLA Nanoparticles*. Scientific World Journal. 2012: 10 p. 2012.



- 200.** YOUNG, H. E. y col. *Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors.* Anatomical Record, v. 264, n. 1, p. 51-62, Sep 2001.
- 201.** ZANNETTINO, A. C. W. y col. *Comparative Assessment of the Osteoconductive Properties of Different Biomaterials In Vivo Seeded with Human or Ovine Mesenchymal Stem/Stromal Cells.* Tissue Engineering Part A, v. 16, n. 12, Dec 2010.
- 202.** ZEBISCH, K. y col. *Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes.* Analytical Biochemistry, v. 425, n. 1, p. 88-90, Jun 2012.
- 203.** ZELKEN, J. A. *First-Person Long-term Follow-up Using Autologous Mosaicplasty for Osteochondral Lesion Accompanying Femoral Head Fracture.* Journal of Orthopaedic Trauma, v. 30, n. 2, p. E70-E74, Feb 2016.
- 204.** ZHANG, J. y col. *A Human iPSC Model of Hutchinson Gilford Progeria Reveals Vascular Smooth Muscle and Mesenchymal Stem Cell Defects.* Cell Stem Cell, v. 8, n. 1, p. 31-45, Jan 2011.
- 205.** ZHANG, L. y col. *An in vitro study of collagen hydrogel to induce the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 100A, n. 10, p. 2717-2725, Oct 2012.
- 206.** ZHANG, W. y col. *Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis.* Bone research, v. 4, p. 15040-15040, 2016.
- 207.** ZHANG, Z. J. y col. *Growth and integration of neocartilage with native cartilage in vitro.* Journal of Orthopaedic Research, v. 23, n. 2, p. 433-439, Mar 2005.
- 208.** ZHAO, J. y col. *Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives.* Journal of Zhejiang University-Science B, v. 14, n. 12, p. 1059-1069, Dec 2013.

- 209.** ZHAO, Y. y col. *Mesenchymal Stem Cell Transplantation Improves Regional Cardiac Remodeling Following Ovine Infarction*. Stem Cells Translational Medicine, v. 1, n. 9, p. 685-695, Sep 2012.
- 210.** ZHEN, G.; CAO, X. *Targeting TGF beta signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis*. Trends in Pharmacological Sciences, v. 35, n. 5, p. 227-236, May 2014.
- 211.** ZSCHARNACK, M. y col. *Repair of Chronic Osteochondral Defects Using Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells in an Ovine Model*. American Journal of Sports Medicine, v. 38, n. 9, Sep 2010.
- 212.** ZUK, P. A. y col. *Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies*. Tissue Engineering, v. 7, n. 2, p. 211-228, Apr 2001.

## PÁGINAS WEB

- DAMARIS. Hueso alveolar. Periodoncia.  
<http://periodoncia5toc.blogspot.com.es/2010/12/hueso-alveolar.html>, Acceso el: 02/05/2016.
- *Explore stem cells*. <http://stemcelloverview.weebly.com/classes-of-stem-cells.html>, Acceso el: 02/05/2016.
- *Joints part 2*. <https://quizlet.com/60157233/joints-part-2-synovial-joint-flash-cards/>, Acceso el: 02/05/2016.
- *Oa joint*.  
[https://www.zoetisus.com/products/pages/rimadyldvm/img/oa\\_joint.png](https://www.zoetisus.com/products/pages/rimadyldvm/img/oa_joint.png), Acceso el: 02/05/2016.
- VALENZUELA, A. L. ¿El ejercicio previo a la artroplastia de rodilla y cadera reduce el dolor y mejora la función? , <http://updates-rehabilitacion.com/el-ejercicio-previo-a-la-artroplastia-de-rodilla-y-cadera-reduce-dolor-y-mejora-la-funcion/>, 2013. Acceso el: 02/05/2016.

- ZAMBELLI, A. Condroprotectores en el manejo de la osteoartritis de perros y gatos. <http://www.seleccionesveterinarias.com/es/articulos/traumatologia-veterinaria/condroprotectores-en-el-manejo-de-la-osteoartritis-de-perros-y-gatos>, 2013. Acceso el: 02/05/2016.







## **INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

D. / Dña.:

### **INTRODUCCIÓN.-**

Se le propone participar en un proyecto de investigación sobre enfermedades del aparato locomotor que será realizado por el Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo la dirección del **Dr. Blanco.**

Este proyecto será realizado en la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña.

### **OBJETIVO DEL PROYECTO.-**

El objetivo de este estudio se centra en estudiar los mecanismos que participan en la patogénesis de las enfermedades del aparato locomotor.

### **DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.-**

Usted ha sido sometido a una intervención quirúrgica en la que se le han extraído tejidos articulares los cuales, siguiendo la normativa de eliminación de residuos biológicos, serán incinerados. Si usted decide participar en este estudio, sus tejidos, en lugar de ser eliminados, serán enviados a la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña para que se almacenen en el Banco de Muestras de dicho Hospital para, posteriormente, realizar los estudios de investigación encaminados a conocer mejor por qué se producen algunas enfermedades del aparato locomotor.

Así mismo se le solicita autorización para la extracción de saliva o 10ml de sangre, siendo extraída esta última siguiendo el procedimiento rutinario para efectuar análisis estándar de sangre.

### **RIESGOS.-**

Usted no va a sufrir ningún tipo de inconveniente o riesgo físico adicional al de la propia intervención quirúrgica a la que se le ha sometido, por consentir la utilización de las muestras que se le han extraído durante la misma.

### **COMPENSACIÓN.-**

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación, independientemente de que los resultados de los estudios que se van a realizar puedan dar lugar a patentes con fines médicos.

## **CONFIDENCIALIDAD.-**

Toda la información que se obtenga de analizar su muestra, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en las investigaciones futuras, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra de sangre no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el mismo momento de la extracción con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en las bases de datos donde figure la información clínica o genética referida a usted. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del equipo investigador, adoptándose las medidas necesarias para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de su muestra de sangre permanezca confidencial.

Es importante que entienda que existe la posibilidad de que sus datos y parte de su muestra sean transferidos a otros equipos de investigación que trabajen en el mismo campo. En tal caso, se asegurará que estos datos sean tratados con la misma confidencialidad descrita anteriormente.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en el proyecto, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

## **NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.-**

Como ya se ha descrito, se adoptarán estrictas medidas de seguridad para garantizar la confidencialidad de los resultados de los estudios realizados.

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se hayan completado los proyectos de investigación.

Usted debe saber que, en cumplimiento de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.



En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, se podrá informar a los afectados o a sus representantes legales.

#### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA.-**

Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria.

Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.

Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos.

Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida y sólo se guardará la información obtenida hasta ese momento.

Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

#### **OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL.-**

Usted puede contactar con cualquier miembro del Servicio de Reumatología del C.H.U. A Coruña si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente, en el teléfono 981176399.

En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre del paciente),

He leído la información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado de ello con \_\_\_\_\_

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

---

**FIRMA DEL PACIENTE**

**Nombre**

**Fecha**

He explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al donante y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

---

**FIRMA**

**Nombre**

**Fecha**

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ACOMPAÑANTE

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre del acompañante del  
paciente), con DNI: \_\_\_\_\_ y en calidad de  
\_\_\_\_\_ (parentesco con el donante) certifico que a  
\_\_\_\_\_ (nombre del paciente)

Se le ha leído la información establecida en este escrito

Se le ha entregado copia de esta información.

Ha podido hacer preguntas sobre el proyecto.

Ha recibido suficiente información sobre el mismo.

Hemos hablado de ello con \_\_\_\_\_

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirar su consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presta libremente su conformidad para participar en el proyecto

Me autoriza a firmar en su nombre.

---

**FIRMA DEL ACOMPAÑANTE DEL PACIENTE**

**Nombre**

**Fecha**

He explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al donante y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

<hr/>	
<b>FIRMA</b>	<b>Nombre</b>
<b>Fecha</b>	







## CERTIFICADO

D. Alberto Centeno Cortés y D. <sup>a</sup> Nieves Domenech García en calidad de presidente y vicepresidente del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) y en virtud de lo dispuesto en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos:

### CERTIFICAN:

- Que D. Francisco J. Blanco García ha presentado para su evaluación por el CEEA el proyecto de investigación titulado: *INGENIERÍA TISULAR EN UN MODELO ANIMAL DE IMPLANTOLOGÍA ORAL*
- Que una vez evaluado dicho proyecto por todos los miembros del CEEA ha obtenido por unanimidad la valoración de APTO conforme a la legislación vigente.
- Que la totalidad del proyecto va a realizarse en las instalaciones de la Unidad de Investigación y la Unidad de Cirugía Experimental del CHUAC inscrita en el Libro de Registro de la Consellería de Agricultura de la Xunta de Galicia como Centro Usuario de Animales de Experimentación con el nº ES150300014801 // 150002AE.
- Que todos los procedimientos de cuidado, manipulación, quirúrgicos y eutanásicos a los que se someta a los animales, serán realizados por el personal de la Unidad de Cirugía Experimental. Dicho personal está cualificado en todos los grupos profesionales: A, B, C, D1 y D2.

Lo cual firmamos y sellamos en A Coruña a 20 de julio de 2012.



D. Alberto Centeno Cortés  
Presidente del CEEA

D. <sup>a</sup> Nieves Domenech García  
Vicepresidente del CEEA









**Tabla 4.** Tabla resumen de los resultados histológicos e inmunohistoquímicos de los constructos de Col I y HS, a 15 y 30 días de cultivo en medio control (*DMEM20%*) y medio condrogénico (Condrog). Los mejores resultados obtenidos por los constructos condrogénicos se sombrearon en verde.

Medio	Días	Soporte	Tinciones e inmunotinciones								
			% Células (H-E)	PCNA	SO	Col II	Agg	VK	Col I	Col X	MMP13
Control <i>DMEM20%</i>	15	Col I	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		Col I + 1%HS	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		Col I + 2%HS	1	1	1	3	3	1	0	3	1
		Col I + 3%HS	1	1	1	1	1	1	0	3	1
	30	Col I	0	1	0	0	0	0	0	0	0
		Col I + 1%HS	2	2	2	6	4	6	2	6	0
		Col I + 2%HS	1	1	1	3	0	1	1	0	0
		Col I + 3%HS	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Condrog.	15	Col I	2	2	4	4	2	0	2	4	0
		Col I + 1%HS	4	3	8	8	8	4	8	8	0
		Col I + 2%HS	1	3	1	2	2	1	1	3	0
		Col I + 3%HS	4	1	12	8	4	0	4	4	4
	30	Col I	4	3	12	12	8	4	4	12	0
		Col I + 1%HS	4	1	12	8	0	4	4	0	0
		Col I + 2%HS	4	1	12	4	0	4	4	4	0
		Col I + 3%HS	4	4	12	12	4	4	4	12	0

**Tabla 5.** Tabla resumen de los resultados histológicos e inmunohistoquímicos de los constructos de Col I y Col II y GAGs, a 30 días de cultivo en medio condrogénico. Los mejores resultados obtenidos por los constructos condrogénicos se sombrearon en verde.

Soporte	Tinciones e inmunotinciones								
	% Células (H-E)	<i>PCNA</i>	<i>SO</i>	<i>Col II</i>	<i>Agg</i>	<i>VK</i>	<i>Col I</i>	<i>Col X</i>	<i>MMP13</i>
<b>Col I +OLH3</b>	3	2	6	3	0	0	0	0	3
<b>Col I +CHS</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Col I +Col II</b>	3	3	9	9	0	0	6	9	0
<b>Col I +Col II +HS</b>	4	3	12	12	0	4	12	4	0
<b>Col I +Col II +CHS</b>	4	2	8	12	0	0	4	4	4







31 de diciembre de 2014

RE: Estancia Clara Sanjurjo Rodríguez

A quien corresponda,

Por la presente comunico que Clara Sanjurjo Rodríguez con DNI 47.353.452V, procedente del grupo de Reumatología del Dr. Francisco J. Blanco García del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), ha realizado una estancia para la colaboración en un proyecto común con el grupo “Control of Stem Cell Potency” del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC).

Dicha estancia ha tenido lugar del 3 de abril de 2014 al 31 de diciembre de 2014 y, bajo mi supervisión, ha trabajado en la generación, crecimiento y caracterización de células madre pluripotentes inducidas (iPS), así como en la diferenciación condrogénica de células MSC-like derivadas de células iPS humanas.

Cordialmente,



Angel Raya, MD, PhD  
ICREA Research Professor  
Group Leader “Control of Stem Cell Potency Group”  
Institute for Bioengineering of Catalonia





# WORKPLACE SUPERVISOR'S REPORT FOR WORK EXPERIENCE PLACEMENT

Please complete the following form and return by post, fax or email to the contact address provided. The information contained in this report will be used as part of the student's final assessment.

Name of supervisors: Dr Elena Jones and Dr Jehan El-Jawhari\_\_\_\_\_

Appointed by (company/institution): Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine, University of Leeds

**Report** of work undertaken as part of work experience placement by the student:

Surname, name: SANJURJO RODRIGUEZ, CLARA

ID Number: 47353452-V

Faculty/School: UNIVERSIDADE DE A CORUÑA (UDC)

Degree programme: PhD IN HEALTH SCIENCES (DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD).

Work placement period (start/end dates): 07-10-2013/16-01-2014

Total number of hours worked: 470

**I certify** that the work undertaken by the student during the placement period was in keeping with the terms of the learning and training project and hereby submit the following assessment of his/her performance during that time:

	EXCELLENT	VERY GOOD	GOOD	AVERAGE	UNSATISFACTORY
Quality of prior learning	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fulfilment of duties and work timetable	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Initiative	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Level of effort	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quality of work	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Problem-solving ability	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Level of skills demonstrated	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Involvement and engagement with company/institution	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## NOTES AND COMMENTS: FROM ELENA JONES:

Since her arrival in Leeds Clara has demonstrated excellent technical capacity, creativity, initiative and strong sense of responsibility. She is someone the team could definitely rely on; in this respect Clara has shown an exceptional level of initiative in the collection and processing of clinical samples, which on many occasions involved working late hours. She could adapt to new clinical environment and new laboratory facilities in Leeds very easily. Clara is a highly motivated person, both in terms of her own career progression, but also in relation to helping others. Clara did not hesitate to take several career-development opportunities that she was offered here (for example, article peer review), which she mastered perfectly. Clara's work in Spain mostly involved cartilage tissue engineering, but she easily switched to the subject of bone tissue engineering showing very fast learning ability. She is very punctual and manages her time very efficiently, by planning her laboratory and office work very carefully. Clara is a very pleasant to work with - the sentiment shared by everyone she interacted with. She has given no occasion for any criticism and was prepared, even very early after her arrival, to present her data at our lab meeting – this showed a good degree of confidence in her own ability. Her oral and written communication skills are beyond by expectation for a non-English speaking student. She has acquired all the skills listed in her training agreement and beyond (for example operating the Graphpad software). To conclude, I only wish Clara was my PhD student or returned to Leeds one day as a very capable Post-Doc!

☒ ADDITIONAL PAGES ATTACHED

Leeds, 09/01, 2014

Signed.: E. Jay

Signed.: Jehan

DEPARTMENT OF RHEUMATOLOGY  
UNIVERSITY OF LEEDS

Comments from Dr Jehan El-Jawhary:

Clara has shown a very good and relevant experience in the work when she joined us. She has shown initiative and ability to produce high quality results. Clara is definitely a hard worker - she was very efficient in fulfillment her duties within the planned timeframe with an excellent ability of problem solving. Clara has demonstrated an effective application of skills she learnt from our lab. Additionally, she was always keen to be involved in our research group activity and social events.







## DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### EDITORIALES

**Autores:** Elena Jones, Clara Sanjurjo-Rodríguez. **Título:** *Stem cell therapy for bone and cartilage defects- can culture- expansion be avoided?* **Revista:** *J Stem Cell Res Ther* 4:e118.doi:10.4172/2157-7633.1000e118. **Fecha de publicación:** 25/01/2014. **Online ISSN:** 2157-7633 JSCRT.

### ARTÍCULOS

- **Autores:** Clara Sanjurjo-Rodríguez, Rocío Castro-Viñuelas, Tamara Hermida-Gómez, Tania Fernández-Vázquez, Isaac Fuentes-Boquete, Silvia Díaz-Prado, Francisco J. Blanco. **Título:** *Ovine mesenchymal stromal cells: morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering.* **Revista:** PlosOne. Enviado en 2016
- **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, R. Ferrer, S. Mora-Castilla, A. Sánchez-Danés, M. Lebourg, M.A. Mateos Timoneda, I. Ochoa, S. Díaz-Prado, J.L. Gómez, M. Monléon, M. Doblaré, J.A. Planell, F.J. Blanco, A. Consiglio, A. Raya. *Chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in bioactive scaffolds.* **Revista:** Stem Cells and Development. Enviado en 2016
- **Autores:** Clara Sanjurjo-Rodríguez, Adela Helvia Martínez-Sánchez, Tamara Hermida-Gómez, Isaac Fuentes-Boquete, Silvia Díaz-Prado, Francisco J. Blanco. **Título:** *Differentiation of human mesenchymal stromal cells cultured on collagen sponges for cartilage repair.* **Revista:** *Histology and Histopathology.* **Fecha publicación:** 03/2016. **Online ISSN:** 1699-5848. **Factor de Impacto** (JCR-2014): 2,096

- **Autores:** Jehan J El-Jawhari, Clara Sanjurjo-Rodríguez, Elena Jones, Peter V Giannoudis. **Título:** Collagen-containing scaffolds enhance attachment and proliferation of non-cultured bone marrow multipotential stromal cells. **Revista:** Journal of Orthopaedic Research. doi: 10.1002/jor.23070. **Fecha publicación:** 12/10/2015. **Factor de Impacto** (JCR-2014): 2,986
- **Autores:** Clara Sanjurjo-Rodríguez, Adela Helvia Martínez-Sánchez, Tamara Hermida-Gómez, Isaac Fuentes-Boquete, Silvia Díaz-Prado, Francisco J. Blanco. **Título:** Human cartilage tissue engineering using type I collagen/heparan sulfate scaffolds. **Revista:** J Regen Med 3:2. doi:10.4172/2325-9620.1000116. **Fecha publicación:** 10/10/2014. **ISSN:** 2325-9620

## PREMIOS

- 1<sup>ER</sup> premio póster “Estudio de un modelo *in vitro* de cerdo de reparación de cartílago articular con células stem mesenquimales y epitaliales de membrana amniótica humana” en el XIII Congreso Nacional de la AEBT (2013).

## PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y JORNADAS

### INTERNACIONALES

- **2016 World Congress on Osteoarthritis (OARSI).** 31 de marzo-3 de Abril de 2016. Amsterdam, Holanda. **Publicación:** *Osteoarthritis and Cartilage* 2016; 24 (Suppl. 1): S169-S170. **ISSN:** 1063-4584 **Factor de**



**Impacto (JCR 2014):** 4,165. Cuartil: 1. **Comunicación:** tipo póster.

**Título del póster:** *Tissue engineering in an in vitro model of human cartilage repair.* **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, R. Castro-Viñuelas, Tamara Hermida-Gómez, I.M. Fuentes-Boquete, F.J. De Toro, F.J. Blanco, S. Díaz-Prado.

- **2015 World Congress on Osteoarthritis (OARSI).** 30 de Abril – 3 de Mayo de 2015. Seattle, Washington, Estados Unidos. **Publicación:** *Osteoarthritis and Cartilage* 2014; 23 (Suppl. 2): A148. **ISSN:** 1063-4584 **Factor de Impacto (JCR 2014):** 4,165. Cuartil: 1. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Human cartilage repair using human mesenchymal stem cells and collagen scaffolds.* **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, T. Hermida-Gómez, I.M. Fuentes-Boquete, F.J. De Toro, F.J. Blanco, S. Díaz-Prado.
- **2014 World Congress on Osteoarthritis (OARSI).** 24-27 de Abril de 2014. Paris, Francia. **Publicación:** *Osteoarthritis and Cartilage* 2014; 22 (Suppl.): S154. **ISSN:** 1063-4584 **Factor de Impacto (JCR 2014):** 4,165. Cuartil: 1. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Cartilage tissue engineering: adult human mesenchymal stromal cells and collagen biomaterials.* **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, A.H. Martínez-Sánchez, T. Hermida-Gómez, I.M. Fuentes-Boquete, J. Buján, F.J. De Toro, S. Díaz-Prado, F.J. Blanco.
- **22nd Annual Congress of the European Association of Tissue Banks (EATB).** 20-22 de Noviembre de 2013. Bruselas, Bélgica. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells cultured on collagen*

*biomaterials*. **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, E. Rendal-Vázquez, A. H. Martínez-Sánchez, T. Hermida-Gómez, I.M. Fuentes-Boquete, J. Buján, F.J. De Toro, F.J. Blanco, S. Díaz-Prado.

- **22nd Annual Congress of the European Association of Tissue Banks (EATB).** 20-22 de Noviembre de 2013. Bruselas, Bélgica. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Synthesis of cartilage-like neo-tissue by the culture of human stem cells over collagen and heparan sulfate scaffolds*. **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, E. Rendal-Vázquez, A. H. Martínez-Sánchez, T. Hermida-Gómez, I.M. Fuentes-Boquete, J. Buján, F.J. De Toro, F.J. Blanco, S. Díaz-Prado.
- **2013 American College of Rheumatology and Association of Rheumatology Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Scientific Meeting.** 25-30 de Octubre de 2013. San Diego, EEUU. **Publicación:** *Arthritis & Rheumatism* 2013; 65 Suppl. 10: S30. **Online ISSN:** 2326-5205. **Factor de Impacto (JCR):** 7,477. Cuartil: 1. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Human mesenchymal stem cells cultured on collagen scaffolds for cartilage tissue engineering*. **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, A.H. Martínez-Sánchez, T. Hermida-Gómez, I.M. Fuentes, F.J. De Toro, J. Buján, S. Díaz-Prado, F.J. Blanco.
- **2013 World Congress on Osteoarthritis (OARSI).** 18-21 de Abril de 2013. Philadelphia, EEUU. **Publicación:** *Osteoarthritis and Cartilage* 2013; 21 (Suppl.): S310. **ISSN:** 1063-4584 **Factor de Impacto (JCR):** 3,904. Cuartil: 1. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *In vitro cartilage tissue engineering using human bone marrow mesenchymal stem cells grown on different collagen scaffolds*. **Autores:** C. Sanjurjo-

Rodríguez, A.H. Martínez-Sánchez, E. Muiños-López, T. Hermida-Gómez, I.M. Fuentes, F.J. De Toro, J. Buján, S. Díaz-Prado, F.J. Blanco.

- **2013 World Congress on Osteoarthritis (OARSI).** 18-21 de Abril de 2013. Philadelphia, EEUU. **Publicación:** *Osteoarthritis and Cartilage* 2013; 21 (Suppl.): S310-311. **ISSN:** 1063-4584 **Factor de Impacto (JCR):** 3,904. Cuartil: 1. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Tissue engineering for cartilage repair: growth and proliferation of hBM-MSCs on scaffolds composed of collagen I and heparan sulphate.* **Autores:** A.H. Martínez-Sánchez, C. Sanjurjo-Rodríguez, T. Hermida-Gómez, E. Muiños-López, I.M. Fuentes, F.J. De Toro, J. Buján, S. Díaz-Prado, F.J. Blanco.
- **2012 American College of Rheumatology and Association of Rheumatology Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Scientific Meeting.** 9-14 de Noviembre de 2012. Washington, D.C., EEUU. **Publicación:** *Arthritis & Rheumatism* 2012; 64 Suppl. 10: S11. **Online ISSN:** 1529-0131. **Factor de Impacto (JCR):** 7,866. Cuartil: 1. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Cartilage Tissue Engineering Using Collagen Scaffolds and Human Mesenchymal Stem Cells.* **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, A.H. Martínez-Sánchez, S. Díaz-Prado, E. Muiños-López, I.M. Fuentes, F.J. De Toro, F.J. Blanco.
- **2012 American College of Rheumatology and Association of Rheumatology Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Scientific Meeting.** 9-14 de Noviembre de 2012. Washington, D.C., EEUU. **Publicación:** *Arthritis & Rheumatism* 2012; 64 Suppl.10: S48. **Online ISSN:** 1529-0131. **Factor de Impacto (JCR):** 7,866. Cuartil: 1.

**Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Tissue Engineering for Articular Cartilage Repair, Culturing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells On Collagen and Heparan Sulphate Scaffolds*. **Autores:** A.H. Martínez-Sánchez, C. Sanjurjo-Rodríguez, S. Díaz-Prado, E. Muiños-López, I.M. Fuentes, F.J. De Toro, J. Buján, F.J. Blanco.

## NACIONALES

- **BioIntegraSaúde 2016.** 12 de Mayo de 2016. Santiago. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** Generación de células madre pluripotentes inducidas (*iPS*) a partir de fibroblastos de pacientes artrósicos. **Autores:** R. Castro-Viñuelas, C. Sanjurjo Rodríguez, T. Hermida-Gómez, I. Fuentes Boquete, F. J. Blanco García, S. Díaz-Prado.
- **Jornadas Cátedra Bioibérica de Ingeniería Tisular y Terapia Celular: cinco años de investigación.** 18 de Noviembre de 2015. A Coruña. **Comunicación:** tipo oral. **Título de la ponencia:** ¿Pueden las células *iPS* ser útiles en la reparación del cartílago articular?
- **BioIntegraSaúde 2015.** 16 de Junio de 2015. Vigo. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Aplicación da enxeñaría tisular nun modelo de reparación in vitro de cartilaxe articular*. **Autores:** M. Souto-Maqueira, C. Sanjurjo Rodríguez, R. Castro-Viñuelas, T. Hermida-Gómez, I. M. Fuentes Boquete, F. J. Blanco García, S. Díaz-Prado.
- **BioIntegraSaúde 2015.** 16 de Junio de 2015. Vigo. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** Ingeniería tisular del hueso y cartílago empleando células madre mesenquimales ovinas y biomateriales de colágeno. **Autores:** R. Castro-Viñuelas, C. Sanjurjo Rodríguez, M. Souto-

Maquieira, T. Hermida-Gómez, I. M. Fuentes Boquete, F. J. Blanco García, S. Díaz-Prado.

- **7th annual IBEC Symposium “Bioengineering for Future Medicine”.** 29 de Septiembre de 2014. Barcelona. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** *Induced Pluripotent Stem Cells and biofunctionalized Scaffolds for Cartilage Engineering.* **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, S. Mora-Castilla, M. Lebourg, I. Ochoa, M. A. Mateos Timoneda, O. Martínez, J. L. Gómez, M. Monléon, M. Doblaré, J. A. Planell, A. Consiglio, F. J. Blanco, A. Raya.
- **BioIntegraSaúde 2014.** 3 de Junio de 2014. A Coruña. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** Ingeniería tisular del hueso empleando células madre mesenquimales ovinas cultivadas en biomateriales de colágeno y beta fosfato tricálcico. **Autores:** C. Sanjurjo Rodríguez, T. Fernández-Vázquez, I. Seijo-Calviño, T. Hermida-Gómez, I. M. Fuentes Boquete, J. Manuel-Cruz, S. Díaz-Prado, F. J. Blanco García.
- **BioIntegraSaúde 2013.** 25 de Abril de 2013. Santiago de Compostela. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** Ingeniería tisular del cartílago mediante el uso de células madre mesenquimales humanas cultivadas en biomateriales de colágeno. **Autores:** C. Sanjurjo Rodríguez, A. H. Martínez Sánchez, T. Hermida-Gómez, I. M. Fuentes Boquete, M. J. Buján Varela, F. J. de Toro Santos, S. M. Díaz-Prado, F. J. Blanco García.
- **XIII Congreso Nacional de la AEBT (Asociación Española de Bancos de Tejidos).** 10-12 de Abril de 2013. Palma de Mallorca. **Comunicación:** tipo póster. 1<sup>ER</sup> PREMIO. **Título del póster:** Estudio de un modelo *in*

*vitro* de cerdo de reparación de cartílago articular con células stem mesenquimales y epitaliales de membrana amniótica humana. **Autores:** E. Muiños López, S.M. Díaz-Prado, T. Hermida-Gómez, E. Rendal-Vázquez, C. Sanjurjo-Rodríguez, I. Fuentes-Boquete, F. J. De Toro, F. J. Blanco.

- **XIII Congreso Nacional de la AEBT (Asociación Española de Bancos de Tejidos).** 10-12 de Abril de 2013. Palma de Mallorca. **Comunicación:** tipo póster. **Título del póster:** Ingeniería tisular del cartílago empleando células madre humanas cultivadas sobre biomateriales de colágeno. **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, T. Hermida-Gómez, I.M. Fuentes-Boquete, J. Buján, F.J. De Toro, S. Díaz-Prado, E. Rendal-Vázquez, F.J. Blanco.
- **XIII Congreso Nacional de la AEBT (Asociación Española de Bancos de Tejidos).** 10-12 de Abril de 2013. Palma de Mallorca. **Comunicación:** tipo oral. **Título de la ponencia:** Síntesis de tejido neocartilaginoso mediante el cultivo de células madre humanas sobre biomateriales de colágeno y heparán sulfato. **Autores:** C. Sanjurjo-Rodríguez, A.H. Martínez-Sánchez, T. Hermida-Gómez, I. M. Fuentes-Boquete, J. Buján, F. J. De Toro, S. Díaz-Prado, E. Rendal-Vázquez, F. J. Blanco.



Research Article

A SCITECHNOL JOURNAL

# Human Cartilage Tissue Engineering Using Type I Collagen/Heparan Sulfate Scaffolds

C. Sanjurjo-Rodríguez<sup>1</sup>, A.H. Martínez-Sánchez<sup>2</sup>, T. Hermida-Gómez<sup>2</sup>, I. Fuentes-Boquete<sup>1</sup>, S. Díaz Prado<sup>1</sup> and F.J. Blanco<sup>3</sup>

Matrix Metalloproteinase-13; MMT: Modified Masson's Trichrome; MSCs: Mesenchymal Stem Cells; OA: Osteoarthritis; OP: Secreted phosphoprotein 1; PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; PG: Proteoglycan; PTHrP: Parathyroid hormone-related protein; qPCR: Real time quantitative polymerase chain reaction; REL: Gene Relative Expression Levels; RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; S: Number of passage; SE: Standard Error; SEM: Scanning Electron Microscopy; SO: Safranin O; SOX9: [SRY (Sex Determining Region Y)-box9]; TBP: TATA Binding Protein; TEM: Transmission Electron Microscopy; TGFβ: Transforming Growth Factor β; VK: Von Kossa

## Abstract

**Introduction:** Cartilage engineering may provide a promising alternative solution to current methods of cartilage repair. The aim of this study was to evaluate the suitability of type I collagen (Col I) scaffolds with and without heparan sulfate (HS) to support attachment, proliferation and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs).

**Materials and Methods:** hBMSCs were cultured in Col I, Col I+1%HS, Col I+2%HS and Col I+3%HS scaffolds in both chondrogenic and non-differentiation media for 15 and 30 days. The resulting neo-tissues were analyzed using histochemistry, immunohistochemistry, electron microscopy (EM) and molecular biology. Collagen released into the media by the constructs was also measured by dye-binding assays.

**Results:** Our results showed successful growth and proliferation of hBMSCs on all scaffolds analyzed. Better results were obtained in chondrogenic cultures after 30 days, in which we observed oval/rounded cells along the scaffolds, and extracellular matrix (ECM) by EM; this ECM was strongly positive for proteoglycan (PG) safranin O staining and staining for type II (Col II). Greater total collagen release was found in supernatants of chondrogenic cultures than in controls. The best results for all analyses were found in scaffolds including HS.

**Conclusions:** We conclude that the Col I and HS scaffolds used in this study are suitable supports for hBMSCs to differentiate toward chondrocyte-like cells in chondrogenic medium. We observe that the addition of HS to Col I scaffolds improves the chondrogenic phenotype of the cells, with Col I+3%HS being the best scaffold.

## Keywords

Cartilage tissue engineering; Scaffold; Mesenchymal Stem Cells (MSCs); Collagen

## Abbreviations

3-D: Three-Dimensional; 20%DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium and 20% of foetal bovine serum; Agg: Aggrecan; ALP: Alkaline Phosphatase; APM1: Adipose most abundant gene transcript 1; cDNA: Complementary Deoxyribonucleic Acid; Col: Collagen; Col I: Type I collagen; Col II: Type II collagen; Col X: Type X collagen; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DSC: Differential Scanning Calorimetry; ECM: Extracellular Matrix; EM: Electron Microscopy; FABP4: Fatty Acid Binding Protein 4; FBS: Foetal Bovine Serum; GAGs: Glycosaminoglycans; hBMSCs: Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; HE: Hematoxylin-Eosin; HS: Heparan Sulfate; LPL: Lipoprotein Lipase; MMP13:

## Introduction

The self-regeneration capability of hyaline cartilage is very limited, due to its avascular nature and lack of innervation [1]. Other factors that contribute to the weak capability for self-repair of this cartilage are low metabolic activity, low cell number, and the inability of chondrocytes to migrate because of their extracellular matrix (ECM) [2,3]. Therefore, most cartilage lesions do not heal spontaneously and may predispose the joint to subsequent development of secondary osteoarthritis (OA) [4].

OA is a degenerative joint disease characterized by deterioration of the integrity of the hyaline cartilage and subchondral bone [5], due to interactions among many factors. There are currently no satisfactory treatments for OA [6]. The available methods to treat OA target the elimination of the pain and inflammation produced during the pathologic process [7]. To date, none of the treatments have achieved hyaline cartilage regeneration, although a fibro cartilaginous tissue has been induced [3] that differs from native joint cartilage in structure and functionality. The course of the disease may finally make it necessary to replace the damaged zone with prosthesis [2]. To avoid joint replacement by surgery, in recent years cell therapy and tissue engineering have been suggested as alternative clinical approaches.

Tissue engineering is a multidisciplinary field integrating engineering and life science, with the goal of developing biological substitutes that restore, maintain or improve the function of damaged tissues having a limited capability for self-repair. To achieve tissue regeneration, three approaches have been studied individually or in combination: cell therapy, induction factors, and scaffolds or biomaterials [8].

**\*Corresponding author:** Silvia Díaz Prado, PhD Bs. Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias da Saúde, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain. Tel: 34-981 176399; Fax: 34-981 176398; E-mail: s.diaz1@udc.es

Francisco J Blanco, PhD MD. Grupo de Bioingeniería Tisular y Terapia Celular (GBTTC-CHUAC), Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Departamento de Medicina. Universidade de Santiago de Compostela C/As Xubias S/N, 15006 A Coruña, Spain, Tel: 34-981 176399; Fax: 34-981 176398; E-mail: fblagar@sergas.es

**Received:** July 20, 2014 **Accepted:** October 10, 2014 **Published:** October 16, 2014

The use of chondrocytes in tissue engineering has disadvantages, including low availability, dedifferentiation when cultured *in vitro*, and a limited proliferative capability, making their use unsuitable for treating OA [9]. Because of their properties, mesenchymal stem cells (MSCs) have been suggested as a promising alternative to chondrocytes for the treatment of cartilage defects [10,11]. *In vitro* chondrogenesis of MSCs requires growth factors, and cell-cell and cell-matrix interactions [12]. Members of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) superfamily play a major role in cartilage development and repair, enhancing chondrocyte proliferation and increasing ECM synthesis. Further, TGF $\beta$ -1 and -3 promote chondrogenesis of MSCs [13].

Scaffolds are natural or synthetic temporary substrates which should provide a suitable three-dimensional (3D) structure to support cell viability and proliferation, allow cellular differentiation, and maintain a specific phenotype [8,14].

Collagen (Col) is a natural biodegradable material that can be reconstituted into fibrous structures simulating native ECM in tissues [15]. Even though we might expect type II Col (Col II), the main protein in the cartilage ECM, to be the most appropriate compound for scaffolds to be used in cartilage tissue engineering, Col I is immunologically less reactive than Col II. Col I have demonstrated competence for supporting cartilage regeneration [16] and allow the growth of chondrocytes with the correct hyaline phenotype [2]. However, to improve cell viability, Col biomaterials must be supplemented with other compounds [15]. On the other hand, heparan sulfate (HS) and proteoglycans (PGs) are known to be involved in chondrocyte differentiation by means of interactions with numerous chondroregulatory molecules [17].

In this study, we used Col I without HS and Col I scaffolds supplemented with HS to establish that they enable human bone marrow MSCs (hBMSCs) to differentiate towards chondrocytes and form chondrogenic constructs useful for cartilage tissue engineering. This study provides information about the potential efficacy of these scaffolds to allow cell transportation to the interior of damaged tissue to enhance regeneration.

## Materials and Methods

### Isolation and culture of hBMSCs

Bone marrow samples used to isolate hBMSCs were obtained from 12 patients (8 females and 4 males, mean age  $76.58 \pm 7.97$ ) undergoing total hip replacement due to OA. Samples were provided by the Rheumatology Service at Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). The donors were not selected and the samples submitted were processed as they arrived at the laboratory. This study was approved by the Ethics Committee of Clinical Investigation of Galicia (Spain) and each donor in the study gave informed consent according to the guidelines of the local ethics committee.

hBMSCs were extracted by washing the bone marrow with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza, Barcelona, Spain) supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS; LabClinics, Barcelona, Spain) (20%DMEM). Isolated cells were cultured in a 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. The resultant cell suspension was subjected to a pre-plating technique [18]. When the cells became 80% confluent at the fourth or fifth passage (S4-S5) a pool of hBMSCs from seven donors was used for both, phenotypic characterization by flow cytometry and multipotent differentiation, as previously described by Díaz-Prado et al. [19]. Characterization was made to confirm the identity of the cells before seeding on the scaffolds,

following the International Society for Cellular Therapy standards [20]. hBMSCs from the other 5 donors were used as a pool to seed on the scaffolds.

A pool of hBMSCs (7 donors) was differentiated toward chondrocyte, adipocyte and osteoblast lineages for 21 days using commercial media (hMSC commercial chondrogenic differentiation medium, Bullekit adipogenic differentiation medium and Bullekit osteogenic medium, Lonza). Differentiation to the three lineages was compared with a negative control of cells cultured in 20%DMEM. All differentiations were done in duplicate. Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation were evaluated by histochemistry, immunohistochemistry and molecular biology (Supplementary Figures 1 and 2).

### Characteristics of scaffolds

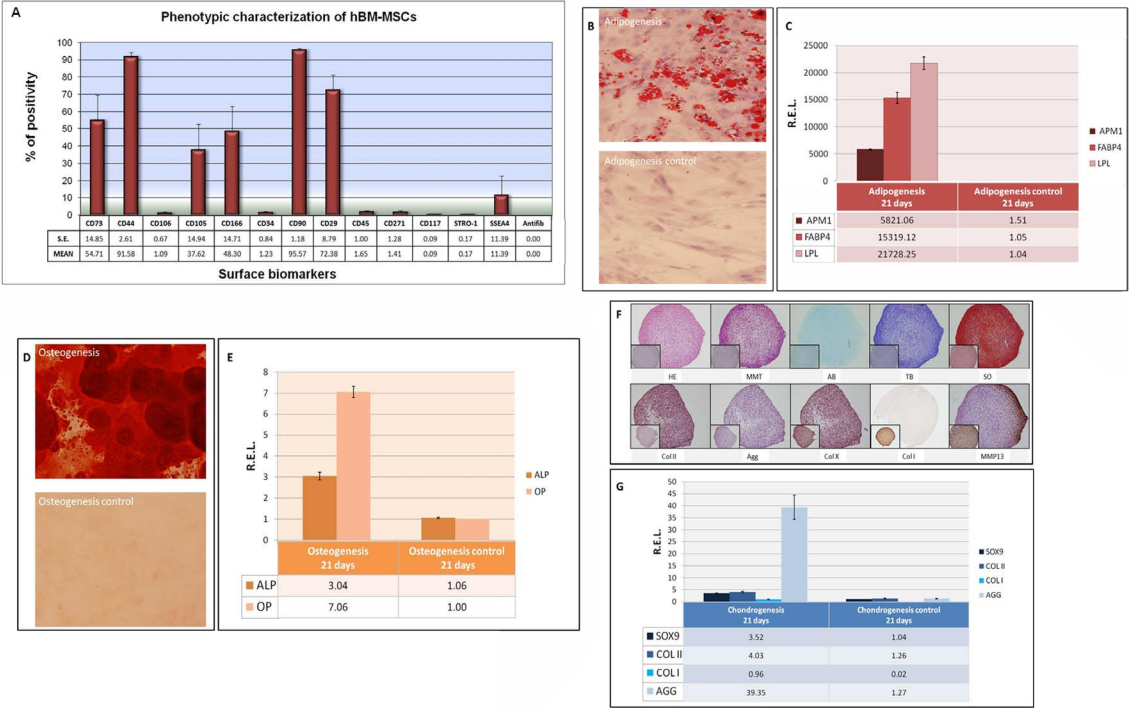
Four different scaffolds with a 1 cm<sup>2</sup> surface, sterilized with  $\gamma$  rays at 25 kGy, were employed. They were composed of Col I from horse tendon mixed with different concentrations of HS. Col I and HS were both prepared by Opocrin S.p.A., (Corlo di Formigine, Modena, Italy). HS concentrations were 0%, 1%, 2%, and 3% in the four scaffolds. Characterization of HS batches used showed 100% purity, a low molar ratio of sulfate ions to carboxylate ions (0.77), high molecular weight (25 kD) and very low anticoagulant activity (<1 APTTU/mg): this last parameter assures lack of hemorrhagic adverse effects. The porosity of the scaffolds increased from  $148.3 \pm 57.9 \mu\text{m}$  (in Col I without HS) to  $406.9 \pm 155.2 \mu\text{m}$  (in Col I +3%HS).

The behavior of the scaffolds as a function of temperature was evaluated by differential scanning calorimetry (DSC). As described by Mentink et al. [21], when Col in the hydrated state is heated, the crystalline triple helix of the Col is transformed into an amorphous random coil, resulting in shrinkage of the Col. As previously reported [22], *Tonset* (the intersection point between the baseline and the linear section of the ascending endothermic curve) can be considered as a representative parameter of the denaturation temperature of the polymer. Scaffolds using Col I displayed a denaturation temperature near  $45.3 \pm 0.3$  °C. DSC analysis demonstrated that both the presence of HS and its concentration affected the thermal behavior of scaffolds. The Col denaturation temperature of Col I +3% HS increased over 50 °C, indicating higher thermal stability of this scaffold, while a percentage of HS lower than 2% did not notably affect the Col thermal transition [Characterization data supplied by OPOCRIN SpA and by Dr. Barbara Ruozzi (TEFARTI group, Life Sciences Dept., University of Modena and Reggio Emilia, Italy)].

### Cell culture on the scaffolds

A pool of hBMSCs (5 donors) was seeded on the scaffolds ( $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) and cultured in normoxia conditions (5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C). Chondrogenic differentiation was induced by culturing the hBMSCs in the chondrogenic medium: hMSC Commercial chondrogenic differentiation medium (Lonza), with 10 ng/ml of TGF $\beta$ -3 (ProSpec-Tany Technogene Ltd, Rehovot, Israel) and 100 nM of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (provided by P. Esbrit from Fundación Jiménez Díaz). As a negative control for non-differentiation, hBMSCs were cultured in 20%DMEM with only PTHrP. In addition, each type of scaffold was cultured without cells in chondrogenic medium, to serve as negative controls for further Col assays and EM analyses. All scaffolds were seeded in triplicate for the different mediums and times of culture.





Supplementary Figure 1

NAME	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER	G/C CONTENT		AMPLICON
			Forward primer	Reverse primer	
SOX9	5'gtaccgcacttgacacaac 3'	5'tcgctctcggtcagaagtctc 3'	58%	52%	72 bp
COL2A1	5'gtgtcagggccaggatgt 3'	5'tcccagtgacagacacagat 3'	61%	50%	116 bp
AGG	5'gcctacgaagcaggctatga-3'	5'-gcacgccataggtcctga-3'	55%	61%	136 bp
FABP4	5'ggatgataaactgggtgtgga 3'	5'cacagaatgttagagttcaatgc 3'	48%	40%	125 bp
APM1	5'ggtgagaaaggagatccaggt 3'	5'tgctgagcgggtatacataggc 3'	52%	52%	147 bp
LPL	5'agaacatccattcactctgc 3'	5'ccattgagcttcaacatgagt 3'	48%	41%	107 bp
ALP	5'gacggaccgcactctc 3'	5'gtgcccgtgtgaattct 3'	67%	56%	109 bp
OP	5'cgcacactgacatccagt 3'	5'ggctgtccaatcagaagg 3'	58%	58%	136 bp
TBP	5'gcccatagtgatctttgcagt 3'	5'cgctggaactcgtctacta 3'	48%	55%	142 bp

Supplementary Figure 2

Culture medium was changed three times a week, and supernatants were analyzed to measure Col released to the medium by the cells.

After 15 and 30 days of culture, each scaffold sample was subjected to three analyses to assess the chondrogenic differentiation: histological and immunohistochemical techniques, EM studies, molecular biology assays and measuring Col in the culture supernatants.

### Histological analysis of constructs

For histochemical and immunohistochemical evaluation, scaffolds were fixed and embedded in paraffin after 15 and 30 days of culture. We separated the analyses of the intensity of staining due to the scaffold from that of the ECM and only took into consideration the positivity due to the ECM.

For cell morphological evaluation, hematoxylin-eosin (HE) and modified Masson's Trichrome (MMT) stains were used. To detect sulfated glycosaminoglycans (GAGs) in the ECM, scaffold sections were stained with safranin O (SO). Von Kossa staining (VK) was used to detect ECM calcification.

Immunohistochemical analyses were performed by incubating deparaffinized sections with primary antibodies to detect the presence of Col I (monoclonal clone), Col II (monoclonal clone), Col X (monoclonal clone), aggrecan (Agg) (monoclonal clone), matrix metalloproteinase-13 (MMP13) (monoclonal clone) (all from Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (monoclonal clone) (Calbiochem, Madrid, Spain). The peroxidase/DAB ChemMate™ DAKO EnVision™ kit (Dako, Barcelona, Spain) was used to determine antigen-antibody interaction.

Histological and immunohistochemical stainings were evaluated using analiSIS® software (version D; Olympus, Germany). Staining intensity and percentage of cells were measured in four different areas of each sample to obtain an average value.

Results were expressed semiquantitatively according to staining intensity: negative or absent (– or 0), weak (+ or 1), moderate (++ or 2) and strong (+++ or 3). In scoring staining intensity, 3 or +++ was assigned to those analyzed samples with metachromasia or higher stain intensity.

The percentage of cells in the scaffold area studied was grouped as 1-24% (scored as 1), 25-49% (scored as 2), 50-74% (scored as 3) and 75-100% (scored as 4). PCNA was also expressed as a percentage of cells immunostained: 1-24% (scored as 1), 25-49% (scored as 2), 50-74% (scored as 3) and 75-100% (scored as 4).

### Electron microscopy

All EM studies were performed by the *Servizo de Apoio á Investigación* (SAI), at the Universidade da Coruña (UDC).

**Transmission electron microscopy:** Scaffolds were analyzed by transmission EM (TEM) to study the ultra structure of the cells. As the negative control, we used scaffolds without cells cultured in chondrogenic medium. The scaffolds were fixed with glutaraldehyde cacodylate buffer and post-fixed with OsO<sub>4</sub>. The samples were dehydrated with a gradual acetone sequence and then embedded in Spurr (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). The ultra structure was studied using a transmission microscope model JEOL JEM 1010 (Jeol, Tokyo, Japan).

**Scanning electron microscopy:** To evaluate the morphometry of cells cultured in chondrogenic medium, scaffolds with and without cells were analyzed by scanning EM (SEM). Both scaffolds were fixed with glutaraldehyde cacodylate buffer and post-fixed with OsO<sub>4</sub>. The samples were then dehydrated with ethanol and critical point drying in CO<sub>2</sub> (Balzers, Liechtenstein, Germany). Finally, the samples were metalized with gold and visualized using a scanning microscope model JEOL JSM 6400 (Jeol).

### Molecular studies of cell differentiation

**Total RNA isolation:** Constructs of each kind of scaffold were sliced and the slices were introduced into tubes with zirconia glass beads and frozen in liquid nitrogen. Tubes were then placed on a Mixer Mill MM200 (Retsch, Haan, Germany) to disintegrate the constructs. Isolation of total RNA from the homogenate was accomplished using Trizol (Invitrogen™, Barcelona, Spain) reagent, following the manufacturer's protocol.

**cDNA synthesis:** DNase I was used for DNase treatment (Fermentas, City, Spain). The RT-PCR reaction was performed from the total RNA using SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™) following the manufacturer's instructions.

### Quantitative Real Time PCR analysis

Using the primers shown in [Supplementary Figure 2](#), qPCR analyses were performed on a LightCycler® 480 Instrument (Roche, Mannheim, Germany) and the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), following the manufacturer's instructions. The initial enzyme activation at 95 °C for 10 min was followed by 60 cycles of target amplification consisting of three sequential steps: 95 °C for 10 s, 61 °C for 5 s, and 72 °C for 7 s. After amplification, a melting curve analysis was performed, following three subsequent steps: 95 °C for 5 s, 65 °C for 60 s and 97 °C for 1 s. Finally, a cooling step was done at 40 °C for 20 s.

The TATA binding protein (*TBP*) was used as the housekeeping gene to normalize the amount of target cDNA. Primers for SOX9 [SRY (sex determining region Y)-box 9] (*SOX9*), Agg (*AGG*) and alpha 1 Col II (*COL II*) were used to evaluate chondrogenesis; fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), adipose most abundant gene transcript 1 (*APM1*), and lipoprotein lipase (*LPL*) to evaluate adipogenesis; and, alkaline phosphatase (*ALP*) and secreted phosphoprotein 1 (*OP*) to evaluate osteogenesis. For data analyses, the LightCycler® 480 Relative Quantification software (Roche) was used. Gene relative expression levels (R.E.L.) were calculated by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method [23].

### Measurement of collagen released

Total Col released by cells cultured on the scaffolds was measured every 3-4 days using the Sircol® Soluble Collagen Assay (Biocolor, Carrickfergus, UK), following the manufacturer's protocol. Absorbance was measured on a spectrophotometer (Infinite® 200 PRO NanoQuant, Tecan, Männedorf, Switzerland). For each sample, concentrations of soluble Col were measured in the total volume of supernatant of the culture media. To avoid including Col from the degradation of scaffolds, the absorbance of control supernatants from scaffolds cultured without cells was measured and subtracted from the data for supernatants from scaffolds with cells. Subsequently, the data were compared to the control groups cultured in 20%DMEM.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS 17.0 for

Windows. p values<0.05 are considered statistically significant. Results are expressed as the mean ± standard error (S.E.).

Results

Cellular evaluation

**Localization, morphology, viability and proliferation of cells in constructs:** To study the percentage of cells relative to the area of scaffold analyzed, the localization of cells, and cell morphology, we interpreted the results obtained from HE and MMT staining. Cells were located on the surface and inside the scaffolds in chondrogenic cultures, but primarily on the surface of their control counterparts (Figure 1, Table 1).

In our evaluation of cells in the constructs we determined that scaffolds with cells cultured in chondrogenic medium showed high

cell numbers and ECM volume in all cases. At 15 days, the highest amount of ECM and number of cells in chondrogenic medium was detected throughout the scaffolds composed of Col I +1%HS (more than 80%) and Col I +3%HS (more than 75%) (Figure 1, Table 1). At 30 days, all the chondrogenic-stimulated supports showed homogenous distribution of ECM as well as cells (more than 80% of cells) throughout the entire scaffold, indicating that cells were able to grow on the surface and inside the scaffolds. The Col I+3%HS scaffold showed the highest percentage of cells: >90% (Figure 1, Table 1). In the controls with non-differentiating medium (20%DMEM) the percentage of cells in culture was very low: <1% in Col I +1%HS, >10% in Col I +2% and >5% in Col I +3%HS (Figure 1, Table 1). After 15 and 30 days in 20%DMEM culture, the Col I without HS scaffold was highly degraded; we detected less than 1% of cells and no ECM. In the rest of the control scaffolds, only Col I+1%HS showed an increase in the percentage of cells (Figure 1, Table 1).

Cell morphology was also observed using HE staining. At both 15 and 30 days of culture, scaffolds containing hBMSCs cultured in chondrogenic medium showed uninucleated and non-vacuolated cells and the presence of oval/rounded cell aggregates, except for Col I+2%HS (Figure 1, Table 1). Scaffolds containing hBMSCs cultured in 20%DMEM alone showed cytoplasmic eosinophilia and nuclear pyknosis after 15 days of culture; cells with fibroblastic morphology became necrotic after 30 days, except for those in Col I+1%HS scaffolds (Figure 1, Table 1).

To establish that cells were capable of proliferation after 15 and 30 days of culture, we looked for the presence of the PCNA proliferation marker in scaffolds containing hBMSCs using immunohistochemical staining. After 15 days, percentage of cells stained was <25% in the non-differentiation controls. In chondrogenic-stimulated scaffolds, the percentage was <50% of the cells stained for PCNA in Col I, <25% in Col I +3%HS and <75% in the remaining biomaterials (Col I +1%HS and Col I +2%HS) (Figure 1, Table 1), indicating a high level of cell proliferation. After 30 days, this marker was barely detectable in control scaffolds (Figure 1, Table 1). In 30-day-chondrogenic-stimulated scaffolds composed of Col I without HS the percentage of cells stained with PCNA was <75% and, in Col I +3%HS was >75%, both were higher than those at 15 days. While scaffolds composed of Col I +1%HS and Col I +2%HS was <25% after 30 days and lower than their respective intensities at 15 days (Figure 1, Table 1).

Molecular profile of the differentiated cells in the constructs

R.E.L. data from qPCR analyses showed that cells in most of the constructs expressed SOX 9, AGG and COL II at 30 days of culture (Figure 2). In all the constructs, the R.E.L. of SOX9 was higher when cells were cultured in chondrogenic medium than when cells were not stimulated (p-values<0.05).

We did not find differences in the R.E.L. of AGG, with the exception of Col I and Col I+3%HS scaffolds. In Col I constructs, AGG expression was higher in control cells (p-value=0.036), while stimulated cells did not showed AGG expression. In Col I+3%HS, the R.E.L. of AGG was higher in stimulated constructs than in their counterpart controls (p-value=0.049) (Figure 2). No differences between any groups were detected in the R.E.L. of COLII (p-values>0.05) (Figure 2). Those results suggest that hBMSCs in chondrogenic-stimulated scaffolds were able to differentiate toward chondrocyte-like cells.

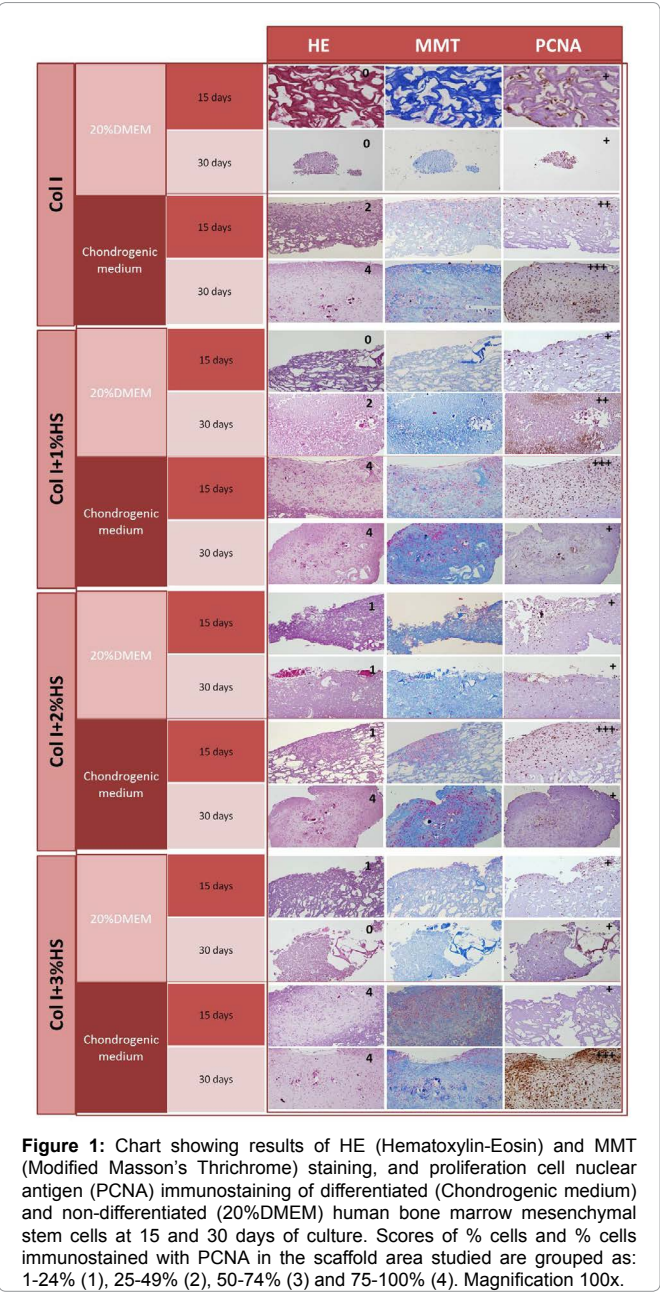
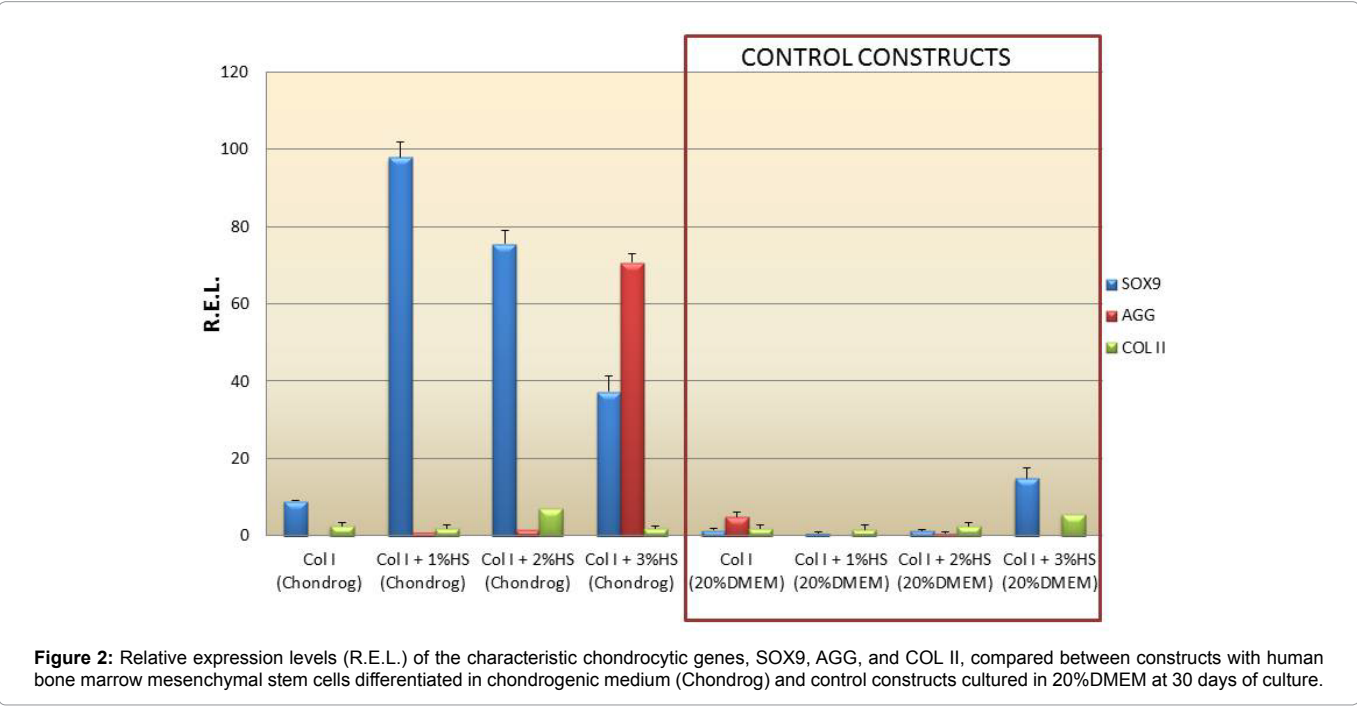




Table 1: Summary of Histological and Immunohistochemical Results.

Medium	Days	Scaffold	Stainings								
			Score of % Cells	Score of % PCNA	SO	Col II	Agg	VK	Col I	Col X	MMP 13
20%DMEM	15	Col I	0	1	0	1	0	0	1	3	1
		Col I + 1% HS	0	1	0	1	1	0	2	2	1
		Col I + 2% HS	1	1	1	3	3	1	0	3	1
		Col I + 3% HS	1	1	1	1	1	1	0	3	1
	30	Col I	0	1	1	3	2	1	1	0	0
		Col I + 1% HS	2	2	1	3	2	3	1	3	0
		Col I + 2% HS	1	1	1	3	0	1	1	0	0
		Col I + 3% HS	0	1	1	3	0	1	0	1	0
CHONDRO	15	Col I	2	2	2	2	1	0	1	2	0
		Col I + 1% HS	4	3	2	2	2	1	2	2	0
		Col I + 2% HS	1	3	1	2	2	1	1	3	0
		Col I + 3% HS	4	1	3	2	1	0	1	1	1
	30	Col I	4	3	3	3	2	1	1	3	0
		Col I + 1% HS	4	1	3	2	0	1	1	0	0
		Col I + 2% HS	4	1	3	1	0	1	1	1	0
		Col I + 3% HS	4	3	3	3	1	1	1	3	0

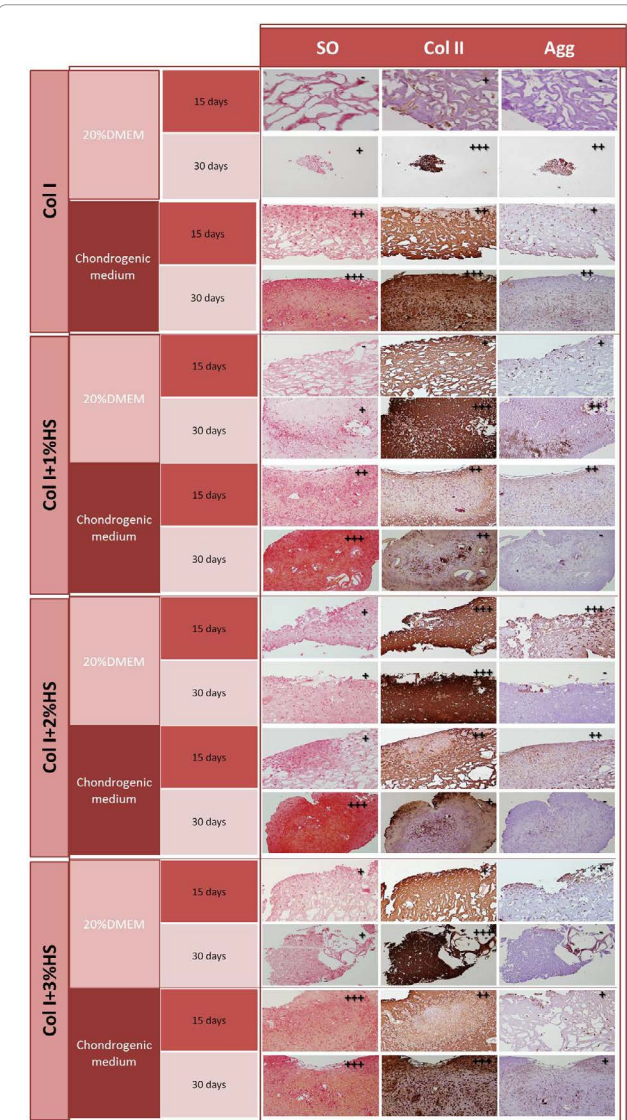
Summary table of histological and immunohistochemical results of culture of human bone marrow mesenchymal stem cells on various scaffolds, at 15 and 30 days in control medium (20%DMEM) and in chondrogenic medium (Chondro). PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; SO: Safranin O; Col: Collagen; Agg: Aggrecan; VK: Von Kossa; MMP13: Matrix metalloproteinase-13; HS: Heparan sulfate. Semiquantitative histological and immunohistochemical staining intensity results: negative or absent (– or 0), weak (+ or 1), moderate (++ or 2) and strong (+++ or 3). % cells in the scaffold area studied grouped as: 1-24% (scored as 1), 25-49% (scored as 2), 50-74% (scored as 3) and 75-100% (scored as 4). % cells immunostained with PCNA in the scaffold area studied grouped as: 1-24% (scored as 1), 25-49% (scored as 2), 50-74% (scored as 3) and 75-100% (scored as 4). Hematoxylin-eosin (HE) and modified Masson's Trichrome (MMT) stains were used. To detect sulfated glycosaminoglycans (GAGs) in the ECM, scaffold sections were stained with Safranin O (SO).



Extracellular matrix evaluation

**Assessment of characteristic cartilage extracellular matrix components:** In control cultures at 15 days, SO staining showed a low amount of sulfated GAGs in Col I+3%HS and was negative in Col I and Col I+1%HS scaffolds (Figure 3, Table 1). At 30 days, all the non-differentiated scaffolds exhibited weak positive SO staining,

indicating a slight increase. At 15 days in culture of biomaterials with chondrogenic-stimulated cells, weak positive SO staining was detected in Col I+2%HS, moderate in Col I and Col I+1%HS, and strong in Col I+3%HS scaffolds. At 30 days, SO staining was strong in all the scaffolds containing cells cultured in chondrogenic medium (Figure 3, Table 1).



**Figure 3:** Chart showing results of Safranin O (SO) staining and immunostaining for Col II (type II collagen) and Agg (aggrecan) of differentiated (chondrogenic medium) and non-differentiated (20%DMEM) human bone marrow mesenchymal stem cells at 15 and 30 days of culture. Staining positivity scores range from absent (-) to strongly stained (+++). Magnification 100x.

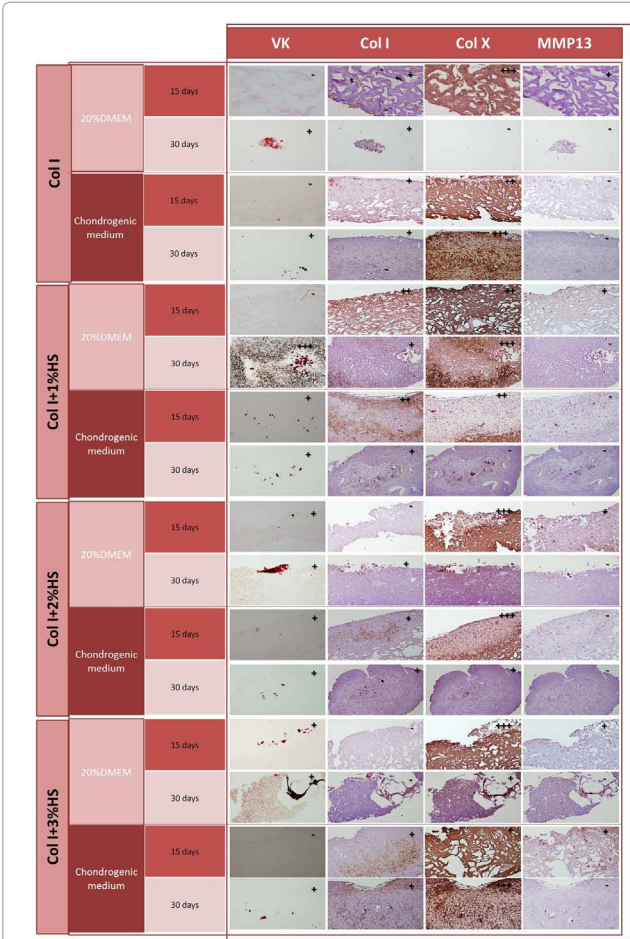
The immunohistochemical analysis of the ECM for Col II, a typical marker for hyaline cartilage, was positive in every scaffold. At 15 days, positivity for Col II staining was moderate in the stimulated scaffolds, increasing at 30 days to strongly positive in Col I and Col I +3%HS scaffolds (Figure 3, Table 1). At 15 days in non-differentiated constructs, staining for Col II was weakly positive in Col I without HS, Col I+1%HS and in Col I+3%HS, but strongly positive in the other scaffolds. At 30 days, positivity of Col II staining was strong in all the control scaffolds, actually stronger than that of some of the stimulated constructs (Figure 3, Table 1).

At 15 days, the immunohistochemical analysis of the ECM for Agg, another important marker for hyaline cartilage, found this molecule present in all study groups in both 20%DMEM controls and chondrogenic-stimulated scaffolds, except for the control Col

I without HS scaffold (Figure 3, Table 1). Col I+2%HS scaffolds in control cultures showed the overall highest positive staining at 15 days. At 30 days, positive staining for Agg was moderate in stimulated Col I and non-differentiated Col I and Col I+1%HS scaffolds, while stimulated Col I+1%HS and Col I+2%HS, and control Col I + 2%HS and Col I+3%HS scaffolds were negative for Agg immunostaining. Weakly positive staining for Agg was detected in stimulated Col I+3%HS scaffolds at 30 days (Figure 3, Table 1).

**Assessment of other extracellular matrix compounds:** At 15 days, VK positivity was weak in non-differentiated Col I+2%HS and Col I+3%HS, and in stimulated Col I+1%HS and Col I+2%HS scaffolds. We did not detect VK staining in non-differentiated Col I and Col I+1%HS and stimulated Col I and Col I+3%HS scaffolds (Figure 4, Table 1). At 30 days, all stimulated scaffolds were weakly positive for VK staining, indicating a slight staining increase in Col I and Col I+3%HS constructs. In the control scaffolds, positivity remained weak in all but Col I+1%HS, which varied from absent to strong staining (Figure 4, Table 1).

Immunodetection for Col I, a marker of fibroblastic differentiation



**Figure 4:** Chart showing results of Von Kossa (VK) staining and immunostaining for type I collagen (Col I), type X collagen (Col X) and metalloproteinase 13 (MMP13) of differentiated (chondrogenic medium) and non-differentiated (20%DMEM) human bone marrow mesenchymal stem cells at 15 and 30 days of culture. Staining positivity scores range from absent (-) to strongly stained (+++). Magnification 100x.

and undifferentiated MSCs, was also assessed. Non-differentiation controls were negative for Col I staining in 15-day-Col I +2%HS and Col I +3%HS scaffolds and weak in the remaining scaffolds, except for the 15-day-20%DMEM Col I+1%HS scaffold, which was moderate (Figure 4, Table 1). Stimulated scaffolds expressed weakly positive values at both 15 and 30 days, except for 15-day-stimulated Col I+1%HS scaffold (Figure 4, Table 1).

When immunohistochemically assessing Col X, a marker for hypertrophic chondrocytes, at 15 days, positivity for this marker was strong in stimulated Col I+2%HS, control Col I, Col I+2%HS and Col I+3%HS scaffolds (Figure 4, Table 1). In stimulated Col I and Col I+1%HS, and in 20%DMEM Col I+1%HS scaffolds, staining for Col X was moderately positive. Stimulated Col I+3%HS scaffolds stained weakly for Col X (Figure 4, Table 1). At 30 days in 20%DMEM, staining intensity for Col X increased from moderate to strong in Col I +1%HS, and decreased in Col I+2%HS and Col+3%HS scaffolds (Figure 4, Table 1). The stimulated scaffolds composed of Col I and Col I+3%HS showed increased staining for Col X, while the remaining scaffolds cultured in chondrogenic medium exhibited a decrease (Figure 4, Table 1).

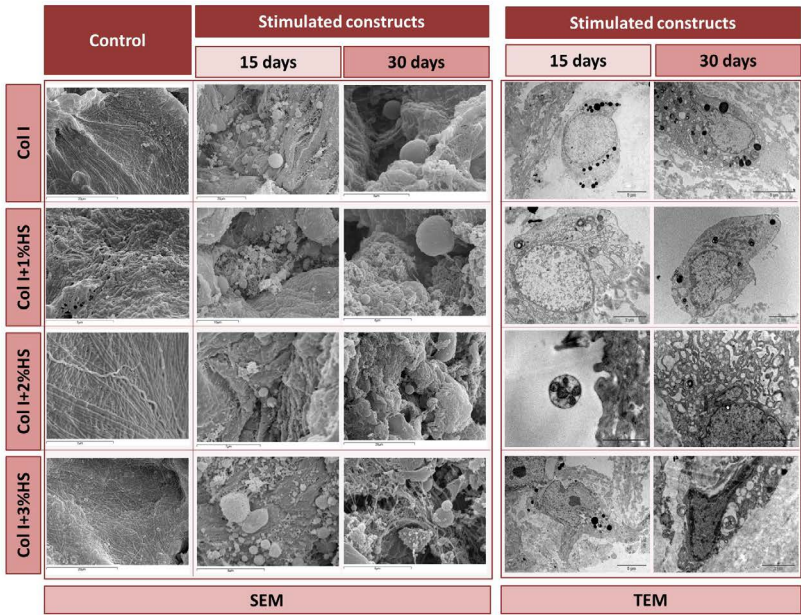
Finally, the immunohistochemical analysis to detect MMP13 showed decreasing positivity in non-differentiated controls after 15 days, being absent at the end of culture at 30 days. Staining for MMP13 was absent in all the stimulated scaffolds, except for Col I+3%HS at 15 days, which had disappeared at 30 days (Figure 4, Table 1).

**Cell and extracellular matrix morphometric and structural evaluation**

**Morphometric analysis:** Those scaffolds with cells cultured in chondrogenic medium and their respective controls without cells were assessed by SEM. Samples were analyzed after 15 and 30 days of culture.

At 15 days, supports that were initially seeded with hBMSCs, showed a high number of cells over the entire studied area. Cell morphology was typically spherical, characteristic of chondrocytes when embedded in native hyaline cartilage. Chondrocyte-like cells in great number attached to the surface of both Col I and blended scaffolds (Col I and HS) (Figure 5). This result indicates that all the scaffolds possess the same properties of cell adhesion. At 30 days, cells had continued to proliferate because cell numbers had increased; cells had spread on the walls of the scaffolds and infiltrated inside the pores (Figure 5). Cells had the native (spherical) morphology of chondrocytes in cartilage, indicating that they were able to maintain the differentiated phenotype. The extracellular environment included large amount of fibrils and vesicles at 15 days in culture (Figure 5), surrounding and even covering the cells; these fibrils and vesicles were probably synthesized and released by the cells. ECM covered wide regions of the scaffolds, suggesting that differentiated cells recognized the surface of these biomaterials as native. At 30 days, the ECM covered nearly the entire surface of the scaffold, making it difficult to highlight the fibrils from the original biomaterial (Figure 5). We were also able to detect large quantities of cellular debris distributed over all the studied areas. Degradation of the biomaterials was gradual, without loss of integrity, suggesting these scaffolds may allow suitable hyaline cartilage formation.

**Ultrastructural analysis:** TEM analysis was performed only on biomaterials seeded with hBMSCs and cultured in chondrogenic medium for 15 and 30 days. At both time points we found cells on every scaffold, varying in size from 10 to 20 µm and showing rounded or ovoid morphology. Nuclei were prominent and well developed, with a diverse morphology from mostly spherical to very heterogeneous. Inside some of the nuclei, we could differentiate the nucleolus as a dense area usually located in the central region of the nucleus. We could also differentiate heterochromatin spread throughout the nucleus, and in some cases, associated with the nuclear membrane (Figure 5).



**Figure 5:** Scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy. Images show human bone marrow mesenchymal stem cells cultured for 15 and 30 days in chondrogenic medium (stimulated constructs). In SEM, images of controls without cells (control) are shown.



We observed highly electron-dense bodies (black vesicles) containing glycogen scattered in the cytoplasm. Less electron-dense vesicles, which varied in intensity, could be packets of secretory material and lysosomes. Their number and size increased from 15 to 30 days of culture. Furthermore, lipid droplets occupied a great proportion of the cytoplasm, seen as large bright vesicles (Figure 5).

In some cases, the rough endoplasmic reticulum was heavily populated with ribosomes with swollen lumens, containing a large amount of secretory material, indicating a high level of biosynthesis (Figure 5). We found a large number of mitochondria at both 15 and 30 days in culture. The size and morphology of mitochondria were variable (Figure 5).

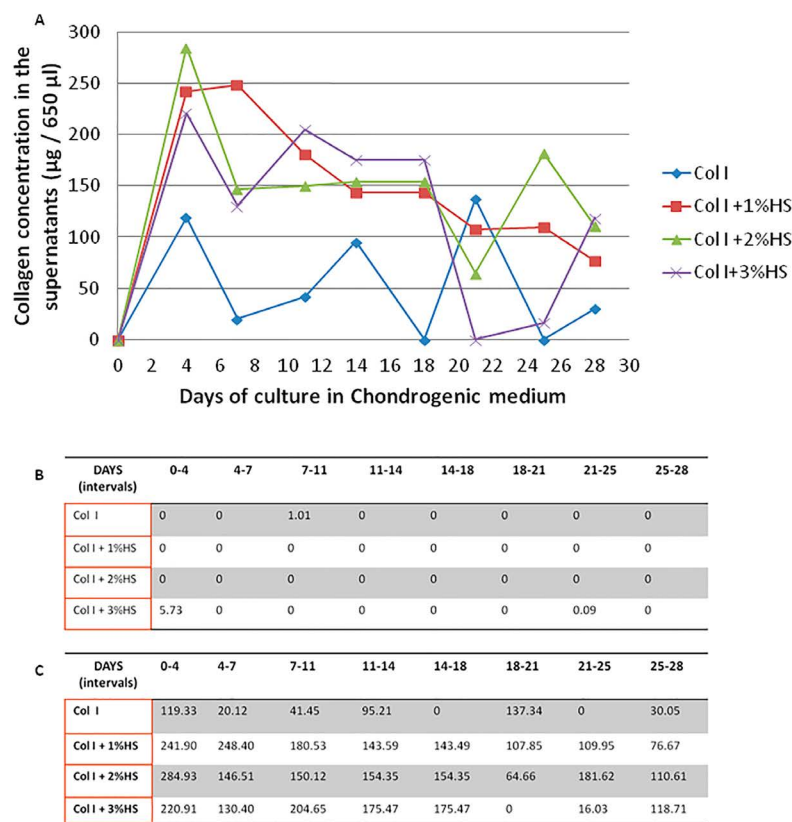
Extracellular areas also showed a great confluence of electron-dense vesicles in proximity to cell surfaces. It was sometimes possible to differentiate vesicles that were being released to the ECM. Both facts indicate activity between the cells and their ECM.

At 15 and 30 days in culture, we were able to clearly differentiate Col II fibrils in close proximity to the cell surfaces surrounding them (Figure 5). These fibrils differed from those constituting the scaffolds (Col I). These collagenous fibrils were irregularly arranged (normal for the ECM of cartilage), and defined a territorial zone of cartilaginous matrix.

Evaluation of total collagen released

As shown in Figure 6, cells cultured in chondrogenic medium released Col into the supernatant at almost all time points analyzed, the exception being from the 14<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> days of culture in the Col I scaffold, and from the 18<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> days in the Col I +3%HS scaffold, during which times we were unable to detect Col release. A tendency for a slight decrease in the Col concentration of supernatants from scaffolds composed of Col I with HS was noted over the culture period. This tendency to decrease was more gradual and constant in Col I +1%HS scaffolds. Col I +2%HS scaffolds presented the highest initial concentration of Col, but from the 18<sup>th</sup> to the 21<sup>st</sup> day of culture it showed a decrease, followed by a final increase at the 25<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> day interval (Figure 6). Finally, supernatants from the Col I +3%HS scaffolds had an initial Col concentration, which stayed nearly constant until the 18<sup>th</sup>-21<sup>st</sup> days of culture, when no Col was detectable in the supernatant; in the final period Col did increase. Col concentration in the supernatants of the Col I scaffold varied considerably and was generally lower than in the other scaffolds.

On the other hand, analyses performed on culture supernatants of cells on scaffolds cultured in 20%DMEM showed no Col release. In a few exceptional cases, we detected a release of Col, which was not significant (in the 7<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> day interval for Col I and in the 0-4<sup>th</sup> day interval, as well as in the 21<sup>st</sup>-25<sup>th</sup> day interval for Col I +3%HS) (Figure 6). Concentrations of Col in the supernatants were



**Figure 6:** (A) Graphic representation of total collagen released into the culture supernatant by chondrogenic-stimulated human bone marrow mesenchymal stem cells over the time of culture. The x-axis represents days of cell culture on the scaffolds in chondrogenic medium; the y-axis represents total collagen concentration measured in culture supernatants. B-C) Table showing µg of total collagen in the volume of culture supernatants (650 µl) from cells cultured in 20%DMEM (B) and in chondrogenic medium (C).

significantly higher ( $p < 0.05$ ) in scaffolds cultured in chondrogenic medium than in scaffolds cultured in 20%DMEM.

## Discussion

Several therapies for repair of joint lesions have been developed. They are focused on the formation of a neo-tissue with biochemical, structural, morphological and functional properties similar to those of endogenous hyaline cartilage [24].

Tissue engineering provides a promising remedy for the treatment of tissue defects, using biodegradable scaffolds, cells and cell factors to construct 3D engineered tissues for *in vivo* implantation [25]. It is currently accepted that 3D *in vitro* culture systems could better mimic the *in vivo* situation than 2D cultures [26]. Biocompatible scaffolds that provide a suitable 3D structure are able to support cell viability and proliferation, maintain the cell-specific phenotype and allow cellular differentiation. The appropriate choice of both cells and biomaterials is the most important aspect of cell-based cartilage engineering [14]. To be selected for tissue engineering [8], the biomaterial supports should have biochemical and biophysical characteristics, such as non-cytotoxicity, porosity, ability to integrate with the surrounding cartilage, and biodegradability [4]. The synthesis of the neo-tissue should take place gradually, as the scaffold degrades, thereby maintaining the structural integrity of the newly formed cartilage [2]. The ideal scaffold should degrade at a rate that optimizes cellular growth and neo-tissue development. It should also have the potential to anchor to the injury site and the porosity to allow nutrient and differentiation factors to flow in and for waste exchange [26]. Although all the biomaterials we employed exhibited slow degradation, it seemed slower in the biomaterial composed only of Col I, while the Col I +3% HS scaffold showed the most rapid degradation.

A number of scaffolds have been fabricated for use in cartilage tissue engineering, such as fibrous structures, porous sponges, woven or non-woven meshes and hydrogels [27,28]. Natural biomaterials employed include Col [29,30], agarose [31,32], fibrin [33,34] and alginate [35,36], among others. Examples of synthetic scaffolds are poly-lactic glycolic acid (PLGA) [37,38] and a polymeric nanofiber [39,40]. These scaffolds are used alone or in combination to develop cell supports [24]. Scaffolds should not induce adverse reactions in the host [41].

Col is a protein found in a high concentration in a variety of tissues [42] and has several properties useful for tissue engineering. One such property is that Col can be degraded by *in situ* collagenases [43], its degradation could result in functional and structural restoration of the damaged tissue. Most current studies are focused on optimization of scaffolds using Col, sometimes in combination with other molecules, such as GAGs, to improve tissue function [42]. The attachment of GAGs to biomaterials may offer an appropriate environment for cellular signaling. GAG matrices modulate neo-synthesized tissue rejection by the host. The potential of these supports arises from several properties that make them compatible with the areas of implantation [44]. In this study, we used Col I biomaterials and compared them with Col I combined with HS. HS chains bind to a variety of ECM and basement membrane components and also function as co-receptors for many growth factors. These biocharacteristics indicate a major role for GAGs in basic biological phenomena like adhesion, migration, proliferation and differentiation of cells [44].

Cells have the capability to grow *in vitro* on a biomaterial with

characteristics similar to those of tissues; this helps us to understand the behavior of cells in complex environments [42]. Although Col II is the major structural element of the cartilage ECM, Col I is immunologically less reactive when implanted in a host [45]. The use of mature cell types, such as chondrocytes, for cell therapy, provides a moderate quality repairing tissue. Moreover, autologous chondrocyte implantation is currently limited to healing focal damage [10]. In many cases, scaffolds are implanted with autologous chondrocytes, resulting in formation of a tissue that differs histologically from the original cartilage [45]. Furthermore, the use of autologous chondrocytes requires an invasive technique due to the need to extract healthy cartilage [24]. These issues have led to the necessity for improving our knowledge of alternative cells, such as MSCs.

In this study, we have seen that hBMSCs not only survive on Col I and HS scaffolds, but also proliferate and differentiate. Cells cultured with chondrogenic-stimulation medium were spread homogeneously throughout the scaffold and a remarkable increase of the ECM occurred. We detected a high level of cell proliferation, the highest being in Col I +3% HS scaffolds. Data obtained from the PCNA assay also suggested high proliferation. Regarding cell differentiation, we successfully cultured hBMSCs on scaffolds composed of Col I and HS in chondrogenic medium, and after 30 days we observed oval/rounded cells and ECM. When no stimulus was present in the culture, the number of cells on the scaffolds decreased from 15 to 30 days, in spite of evidence of some proliferation. These cells, however, had a fibroblastic morphology, indicating that no differentiation took place. Also, in these non-stimulated cultures, cells were located only on the surface of the biomaterials and, after 30 days, little ECM was present.

The use of TGF $\beta$  in the culture of MSCs favors chondrogenic differentiation as well as ECM formation [46,47]. However, MSCs under chondrogenic induction by TGFs have shown a hypertrophic phenotype [48].

In our study, the molecular characterization of the differentiated hBMSCs cultured in chondrogenic medium with TGF $\beta$ -3, expressed characteristic genes of hyaline cartilage, such as SOX9, COL II and AGG. Although there was no difference in gene expression of COL II between controls and stimulated cells, we found higher expression of SOX9 and AGG in most of the differentiated constructs, suggesting that neo-formation of such tissue was really taking place in our biomaterials. These results were supported by immunohistochemical detection of Col II in the ECM, with Col II staining intensely in all the study groups at 30 days of culture. PGs were also strongly stained by SO in chondrogenic constructs and weakly in the non-differentiated ones. Agg, representing most of the PG in cartilage, was detected in all the constructs at 15 days, but in only a few stimulated constructs after 30 days. These results in contrast with the beginning of AGG expression at 30 days could indicate that hBMSCs were in an early state of differentiation.

Col X was present in all stimulated and non-stimulated groups we studied. Mwale et al. [49] found that type X Col was detectable in undifferentiated MSCs and concluded that Col X is not a good marker for chondrocyte hypertrophy during early MSC differentiation. Because MMP13 was absent in all the groups of our study, we could confirm that there was no hypertrophy.

After 30 days, we found weakly positive mineralization in both stimulated and control constructs on histochemical analysis with VK, except in Col I+1%HS control scaffolds. Different data were obtained by inducing chondrogenic differentiation of MSCs in scaffolds



composed of polycaprolactone (PCL), where mineralization of the new ECM was detected after 45 days in culture [50]. Hellingman et al. [51] established that a higher level of mineralization *in vitro* does not imply mineralization *in vivo*. Another study showed that calcification can be due to some variations in the surface tension of oxygen or to the pH of the media [50]. In our study, it is important to note that the degree of calcification in the stimulated cells was lower than that of controls.

Col release to the culture medium by cells took place throughout the 30 days of culture on stimulated scaffolds, indicating a high production of Col due to the synthesis of new cartilage-like tissue. We detected no Col in the supernatant of scaffolds cultured in 20%DMEM, suggesting that chondrogenic differentiation of stimulated hBMSCs was successful. Col release was less in the scaffolds composed of Col I than in the other scaffolds with HS, indicating the Col I with HS scaffolds are more favorable for hBMSCs differentiation.

Finally, we confirmed chondrogenic differentiation in the scaffolds by TEM and SEM, detecting high amounts of electron-dense vesicles, the presence of which is characteristic of cells that are synthesizing ECM in neo-cartilage [52]. Many of the chondrocyte-like cells possessed a highly developed pericellular capsule with a band of densely bundled Col fibers, consistent with TEM of articular cartilage matrices *in vivo* [53]. The SEM analysis showed a gradual degradation of the biomaterials.

The results obtained in this study suggest that Col I +3% HS is the most suitable candidate for use as a scaffold for cartilage repair. This can be due to three reasons: 1) the higher porous size probably provides a better environment for proliferation, 2) there is a positive balance between formation of neo-tissue and the degradation of scaffold and, 3) the higher HS concentration could be the responsible of the better chondrogenic phenotype.

We conclude that the Col I and HS scaffolds used in this study are suitable supports for hBMSC to differentiate toward chondrocyte-like cells at both 15 and 30 days in chondrogenic medium; these scaffolds enhance the maintenance of the typical chondrocyte phenotype. Furthermore, cells on these scaffolds were able to synthesize a cartilage-like ECM, giving rise to a cartilaginous-like tissue *in vitro*. Further studies are needed to highlight the usefulness of Col I and HS scaffolds for regenerating cartilage damage and their capacity for integration with surrounding host tissue.

## Acknowledgements

We want to thank Bruna Parma from Opocrin, S.P.A. for supplying all the biomaterials; Dr Barbara Ruozzi (TEFARTI group, Life Sciences Dept., University of Modena and Reggio Emilia, Italy) for supplying scaffold characterization data; P. Esbrit (Fundación Jiménez Díaz) for supplying the PTHrP; Julia Buján and Natalio García from the Department of Medical Specialties; the Department of Medical Specialties, Universidad Alcalá de Henares; Ada Castro-Couceiro, Ph.D. and Catalina Sueiro-López, Ph.D. from research support services of the Universidade da Coruña (SAI-UDC); and laboratory technicians: María José Sánchez-Dopico, Purificación Filgueira-Fernández and Noa Goyanes-Rey from INIBIC-CHUAC for their support and assistance.

This study was supported by grants: Servizo Galego de Saúde; Cátedra Bioiberica from Universidade da Coruña and Instituto de Salud Carlos III CIBER BBN; CAM (S2009/MAT-1472); REDICENT (Rede de Investigación en Células Nai e Terapia Celular); Universidade da Coruña (UDC); Clara Sanjurjo-Rodríguez is a beneficiary of a fellowship from Diputación de A Coruña, Spain.

## References

1. Remya NS, Nair PD (2013) Engineering cartilage tissue interfaces using a natural glycosaminoglycan hydrogel matrix An *in vitro* study. *Mat Sci Eng C-Mat Bio Appl* 33: 575-582.
2. Negri S, Fila C, Farinato S, Bellomi A, Pagliaro PP (2007) Tissue engineering: chondrocyte culture on type 1 collagen support. Cytohistological and immunohistochemical study. *J Tissue Eng Regen Med* 1: 57-63.
3. Meretoja VV, Dahlin RL, Wright S, Kasper FK, Mikos AG (2013) The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds. *Biomaterials* 34: 4266-4273.
4. Dhollander AA, Guevara Sánchez VR, Almqvist KF, Verdonk R, Verbruggen G, et al. (2012) The use of scaffolds in the treatment of osteochondral lesions in the knee: current concepts and future trends. *J Knee Surg* 25: 179-186.
5. Ishiguro N, Kojima T, Poole AR (2002) Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci* 65: 73-84.
6. Khoshgoftar M, van Donkelaar CC, Ito K (2011) Mechanical stimulation to stimulate formation of a physiological collagen architecture in tissue-engineered cartilage: a numerical study. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 14: 135-144.
7. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, et al. (2007) Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 9: 213.
8. Gloria A, De Santis R, Ambrosio L (2010) Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *J Appl Biomater Biomech* 8: 57-67.
9. Tritz-Schiavi J, Charif N, Henrionnet C, de Isla N, Bensoussan D, et al. (2010) Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 20: 167-174.
10. Facchini A, Lisignoli G, Cristino S, Roseti L, De Franceschi L, et al. (2006) Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology* 43: 471-480.
11. López-Ruiz E1, Perán M, Cobo-Molinos J, Jiménez G, Picón M, et al. (2013) Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 246-258.
12. Varghese S, Hwang NS, Canver AC, Theprungsirikul P, Lin DW, et al. (2008) Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol* 27: 12-21.
13. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K (2012) Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res* 347: 613-627.
14. Cavallo C, Desando G, Columbaro M, Ferrari A, Zini N, et al. (2012) Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hyaluronan scaffold: Rationale for its use in the treatment of cartilage lesions. *J Biomed Mater Res A* 101: 1559-1570.
15. Chan BP, Leong KW (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 17 Suppl 4: 467-479.
16. Zhang L, Yuan T, Guo L, Zhang X (2012) An *in vitro* study of collagen hydrogel to induce the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 100: 2717-2725.
17. Kim-Safran CB, Gomes RR, Brown AJ, Carson DD (2004) Heparan sulfate proteoglycans: coordinators of multiple signaling pathways during chondrogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72: 69-88.
18. Richler C, Yaffe D (1970) The *in vitro* cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol* 23: 1-22.
19. Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Esther Rendal-Vazquez M, Fuentes-Boquete I, et al. (2010) Multilineage Differentiation Potential of Cells Isolated From the Human Amniotic Membrane. *J Cell Biochem* 111: 846-857.
20. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
21. Mentink CJ, Hendriks M, Levels AA, Wolffenbuttel BH (2002) Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. *Clin Chim Acta* 321: 69-76.
22. Ruozzi B, Parma B, Croce MA, Tosi G, Bondioli L, et al. (2009) Collagen-based modified membranes for tissue engineering: Influence of type and molecular weight of GAGs on cell proliferation. *Int J Pharm* 378: 108-115.

23. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
24. Fuentes-Boquete IM, Arufe Gonda MC, Díaz Prado SM, Hermida Gómez T, de Toro Santos FJ, et al. (2008) Cell and Tissue Transplant Strategies for Joint Lesions. *Open Transplant J* 2: 21-28.
25. Xu C, Lu W, Bian S, Liang J, Fan Y, et al. (2012) Porous collagen scaffold reinforced with surfaced activated PLLA nanoparticles. *Scientific World Journal* 2012: 695137.
26. Seo S, Na K (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011: 806891.
27. Tritz J, Rahouadj R, de Isla N, Charif N, Pinzano A, et al. (2010) Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering. *Soft Matter* 6: 5165-5174.
28. Yuan T, Zhang L, Feng L, Fan H, Zhang X (2010) Chondrogenic differentiation and immunological properties of mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogel. *Biotechnol Prog* 26: 1749-1758.
29. Zheng L, Fan HS, Sun J, Chen XN, Wang G, et al. (2010) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: an in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 93: 783-792.
30. Cao H, Xu SY (2008) EDC/NHS-crosslinked type II collagen-chondroitin sulfate scaffold: characterization and in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med* 19: 567-575.
31. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F (2004) Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25: 3211-3222.
32. Mauck RL, Soltz MA, Wang CCB, Wong DD, Chao PHG, et al. (2000) Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng* 122: 252-260.
33. Scotti C, Mangiavini L, Boschetti F, Vitari F, Domeneghini C, et al. (2010) Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18: 1400-1406.
34. Sage A, Chang AA, Schumacher BL, Sah RL, Watson D (2009) Cartilage outgrowth in fibrin scaffolds. *Am J Rhinol Allergy* 23: 486-491.
35. Herlofsen SR, Kuechler AM, Melvik JE, Brinchmann JE (2011) Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Self-Gelling Alginate Discs Reveals Novel Chondrogenic Signature Gene Clusters. *Tissue Eng Part A* 17: 1003-1013.
36. Endres M, Wenda N, Woehlecke H, Neumann K, Ringe J, et al. (2010) Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection. *Acta Biomater* 6: 436-444.
37. Kang SW, Lee SJ, Kim JS, Choi EH, Cha BH, et al. (2011) Effect of a scaffold fabricated thermally from acetylated PLGA on the formation of engineered cartilage. *Macromol Biosci* 11: 267-274.
38. Han SH, Kim YH, Park MS, Kim IA, Shin JW, et al. (2008) Histological and biomechanical properties of regenerated articular cartilage using chondrogenic bone marrow stromal cells with a PLGA scaffold in vivo. *J Biomed Mater Res A* 87A: 850-861.
39. Alves da Silva ML, Martins A, Costa-Pinto AR, Costa P, Faria S, et al. (2010) Cartilage tissue engineering using electrospun PCL nanofiber meshes and MSCs. *Biomacromolecules* 11: 3228-3236.
40. Casper ME, Fitzsimmons JS, Stone JJ, Meza AO, Huang Y, et al. (2010) Tissue engineering of cartilage using poly-epsilon-caprolactone nanofiber scaffolds seeded in vivo with periosteal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 981-991.
41. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, et al. (2008) Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 15: 88-99.
42. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F (2010) Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3: 1863-1887.
43. Tedder ME, Liao J, Weed B, Stabler C, Zhang H, et al. (2009) Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15: 1257-1268.
44. Pieper JS, van Wachem PB, van Luyn MJA, Brouwer LA, Hafmans T, et al. (2000) Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials* 21: 1689-1699.
45. De Franceschi L, Grigolo B, Roseti L, Facchini A, Fini M, et al. (2005) Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 75: 612-622.
46. Janjanin S, Li WJ, Morgan MT, Shanti RA, Tuan RS (2008) Mold-shaped, nanofiber scaffold-based cartilage engineering using human mesenchymal stem cells and bioreactor. *J Surg Res* 149: 47-56.
47. Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, Toneyuzzi S, Grassi F, et al. (2005) Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomaterials* 26: 5679-5686.
48. Bian L, Zhai DY, Mauck RL, Burdick JA (2011) Coculture of Human Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes Reduces Hypertrophy and Enhances Functional Properties of Engineered Cartilage. *Tissue Eng Part A* 17: 1137-1145.
49. Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J (2006) Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res* 24: 1791-1798.
50. Abrahamsson CK, Yang F, Park H, Brunger JM, Valonen PK, et al. (2010) Chondrogenesis and mineralization during in vitro culture of human mesenchymal stem cells on three-dimensional woven scaffolds. *Tissue Eng Part A* 16: 3709-3718.
51. Hellingman CA, Koevoet W, van Osch GJ (2012) Can one generate stable hyaline cartilage from adult mesenchymal stem cells? A developmental approach. *J Tissue Eng Regen Med* 6: e1-1e11.
52. Danišovic L, Lesný P, Havlas V, Teyssler P, Syrová Z, et al. (2007) Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Appl Biomater* 5: 139-150.
53. Wilson R, Diseberg AF, Gordon L, Zivkovic S, Tatarczuch L, et al. (2010) Comprehensive Profiling of Cartilage Extracellular Matrix Formation and Maturation Using Sequential Extraction and Label-free Quantitative Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 9: 1296-1313.

## Author Affiliations

Top

<sup>1</sup>Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias da Saúde, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain.

<sup>2</sup>Grupo de Bioingeniería Tisular y Terapia Celular (GBTTC-CHUAC), Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, C/As Xubias S/N, 15006 A Coruña, Spain.

<sup>3</sup>Grupo de Bioingeniería Tisular y Terapia Celular (GBTTC-CHUAC), Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Departamento de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, C/As Xubias S/N, 15006 A Coruña, Spain.

## Submit your next manuscript and get advantages of SciTechnol submissions

- ❖ 50 Journals
- ❖ 21 Day rapid review process
- ❖ 1000 Editorial team
- ❖ 2 Million readers
- ❖ More than 5000
- ❖ Publication immediately after acceptance
- ❖ Quality and quick editorial, review processing

Submit your next manuscript at • [www.scitechnol.com/submission](http://www.scitechnol.com/submission)

# Differentiation of human mesenchymal stromal cells cultured on collagen sponges for cartilage repair

Clara Sanjurjo-Rodriguez<sup>1\*</sup>, Adela Helvia Martínez-Sánchez<sup>2\*</sup>, Tamara Hermida-Gómez<sup>2</sup>, Isaac Fuentes-Boquete<sup>1</sup>, Silvia Díaz-Prado<sup>1</sup> and Francisco J. Blanco<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cell Therapy and Regenerative Medicine Unit, Institute of Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), University Hospital Complex A Coruña (CHUAC), Galician Health Service (SERGAS), Department of Medicine, Faculty of Health Sciences, University of A Coruña, Campus de A Coruña, <sup>2</sup>Tissular Bioengineering and Cell Therapy Unit (GBTTC-CHUAC), Rheumatology Group, Institute of Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), University Hospital Complex A Coruña (CHUAC), Galician health service (SERGAS) and <sup>3</sup>Tissular Bioengineering and Cell Therapy unit (GBTTC-CHUAC), Rheumatology Group, Institute of Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), University Hospital Complex A Coruña (CHUAC), Galician Health Service (SERGAS), University of A Coruña, A Coruña, Spain.

\*Both Authors contributed equally

**Summary.** Aim: The aim of this study was to evaluate proliferation and chondrogenic differentiation of human bone-marrow mesenchymal stromal cells (hBMSCs) cultured on collagen biomaterials. Materials and Methods: hBMSCs were seeded on five different collagen (Col) sponges: C1C2 (types I and II Col), C1C2HS (types I and II Col plus heparan sulphate (HS)), C1C2CHS (types I and II Col plus chondroitin sulphate (CHS)), C1-OLH3 (type I Col plus low molecular weight heparin) and C1CHS (type I Col plus CHS). The resulting constructs were analyzed by histological and immunohistochemical staining, molecular biology and electron microscopy. Col released into culture media was measured by a dye-binding method Results: hBMSCs on biomaterials C1C2, C1C2HS and C1C2CHS had more capacity to attach, proliferate and synthesize Col II and proteoglycans in the extracellular matrix (ECM) than on C1-OLH3 and C1CHS. The presence of aggrecan was detected only at the gene level. Total Col liberated by the

cells in the supernatants in all scaffold cultures was detected. The level of Col I in the ECM was lower in C1-OLH3 and that of Col II was highest in C1C2 and C1C2HS. Electron microscopy showed differently shaped cells, from rounded to flattened, in all constructs. Col fibers in bundles were observed in C1C2CHS by transmission electron microscopy. Conclusions: The results show that Col I and Col II (C1C2, C1C2HS and C1C2CHS) biomaterials allowed cell proliferation and chondrogenic-like differentiation of hBMSCs at an early stage. Constructs cultured on C1C2HS and C1C2CHS showed better cartilage-like phenotype than the other ones.

**Abbreviations.** 3D, three-dimensional; AB, alcian blue; Agg/AGG, aggrecan; BMSCs, bone-marrow mesenchymal stromal cells; CHS, chondroitin sulphate; Col, collagen; Col I/COLI, type I collagen; Col II/COLII, type II collagen; Col X/COLX, type X collagen; C1C2, biomaterials of types I and II collagen; C1C2HS, biomaterials of types I and II collagen plus heparan sulphate; C1C2CHS, biomaterials of types I and II collagen plus chondroitin sulphate; C1-OLH3, biomaterials of type I collagen plus low molecular weight heparin; C1CHS, biomaterials of type I collagen plus chondroitin sulphate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECM, extracellular matrix; FBS, foetal bovine serum; GAGs, glycosaminoglycans; H-E, hematoxylin and eosin; hBMSCs, human bone-marrow mesenchymal stromal cells; HS, heparan sulphate; MT, Masson's trichrome; OA, osteoarthritis; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PGs, proteoglycans; q-PCR, real time quantitative PCR; REL, Relative Expression Levels; RT-PCR, reverse transcriptase PCR; SO, Safranin O; SEM, scanning electron microscopy; SOX9, SRY (sex determining region Y), box 9; TBP, TATA binding protein; TGFβ-3, Transforming growth factor β-3; TEM, transmission electron microscopy

*Offprint requests to:* Silvia Díaz-Prado, Cell Therapy and Regenerative Medicine Unit, Institute of Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), University Hospital Complex A Coruña (CHUAC), Galician health service (SERGAS), Department of Medicine, Faculty of health sciences, University of A Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain. e-mail: [s.diaz1@udc.es](mailto:s.diaz1@udc.es) or Francisco J. Blanco, Tissular, Bioengineering and Cell Therapy Unit (GBTTC-CHUAC), Rheumatology group, Institute of Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), University Hospital Complex A Coruña (CHUAC), Galician health service (SERGAS), University of A Coruña, C/As Xubias S/N, 15006 A Coruña, Spain. Telf. 34-981 176399. Fax. 34-981 176398. e-mail: [fblagar@sergas.es](mailto:fblagar@sergas.es)  
DOI: 10.14670/HH-11-754



**Key words:** Tissue Engineering, Osteoarthritis, Mesenchymal Stromal Cells, Biomaterials, Chondrogenesis

## Introduction

Hyaline cartilage is composed of chondrocytes embedded in a self-produced extracellular matrix (ECM), primarily composed of proteoglycans (PGs) and a fibrillar collagen (Col) network in which type II Col represents approximately 90% of the Col mass (Grigolo, et al., 2002a; Negri et al., 2007; Han et al., 2011).

Injured cartilage has serious limitations for self-repair (Zhang et al., 2012) due to its intrinsic characteristics (Fuss et al., 2000; Lee et al., 2006; Negri et al., 2007). Therefore, degradation of the ECM molecular components due to impairment of chondrocyte function or cell death can result in loss of tissue function and lead to osteoarthritis (OA) (Chen et al., 2001; Hollander et al., 2010).

OA is a chronic degenerative joint disorder characterized by pain and disability and has a worldwide impact (Matsumoto et al., 2009; Kock et al., 2012). Therapeutic and surgical treatments, (Ehlers et al., 1999; Hunziker, 2002; Fuentes-Boquete et al., 2007; Fuentes-Boquete et al., 2008; Maher et al., 2010) have thus far led to variable and unsatisfactory outcomes (Tuli et al., 2003; Steinert et al., 2007; Maher et al., 2010; Cavallo et al., 2012; Kock et al., 2012).

Cartilage tissue engineering provides a promising avenue for restoring, replacing or regenerating defective cartilage using scaffolds, cells and cell factors to construct three-dimensional (3D) engineered tissues (Chan and Leong, 2008).

Col sponges have been reported to be suitable biomaterials for cartilage engineering (Hunziker, 2002; Claus et al., 2012; Xu et al., 2012). Col biomaterials have also been supplemented for improved cell viability (Chan and Leong, 2008), including a mixed biomaterial of Col and glycosaminoglycans (GAGs) (Jin et al., 2007).

There is controversy in the use of chondrocytes for cartilage tissue engineering, with bone-marrow mesenchymal stromal cells (BMSCs) being the preferred alternative (Varghese et al., 2008; Markway et al., 2010).

The immunogenic, anti-inflammatory and immunosuppressive characteristics (Hunziker, 2002; Hollander et al., 2010; Ohishi and Schipani, 2010) of human BMSCs (hBMSCs) and their capacity to differentiate into different mesodermal tissues, including cartilage (Wakitani et al., 2002; Hermida-Gomez et al., 2011; Cavallo et al., 2012; Cicione et al., 2015), make them ideal candidates. Transforming growth factor  $\beta$ -3 (TGF $\beta$ -3) has been widely utilized for chondrogenic differentiation (Lisignoli et al., 2005; Lee, et al., 2010a; Kock et al., 2012; Melrose et al., 2012).

The aim of this study was to evaluate the capacity for proliferation and chondrogenic differentiation of hBMSCs cultured on biomaterials of Col I and Col II

mixed with GAG to form constructs useful for cartilage tissue engineering.

## Materials and methods

### *Isolation and culture of mesenchymal stromal cells*

Bone marrow samples used to isolate hBMSCs were obtained from 21 patients (mean age  $74.66 \pm 10.25$ ) undergoing total hip replacement due to OA. Samples were provided by the Orthopedic Department of University Hospital Complex A Coruña. The local ethics committee approved this study and informed consent was obtained from all donors.

hBMSCs were extracted by washing the bone marrow with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Lonza, Spain) and cultured in the same medium as described by Hermida-Gomez et al. (2011). When the hBMSCs became 80% confluent in culture, they were sub-cultured. To perform the studies, cells at 3rd passage were unequally pooled from different donors, thus avoiding interdonor variability.

### *Cell characterization*

hBMSCs were characterized by flow cytometry (pool of 4 donors: mean age  $76.25 \pm 2.87$ ) and for multipotentiality (pool of 17 donors: mean age  $74.29 \pm 11.36$ ), as assessed by their capability to differentiate toward different cell types, as previously described (Díaz-Prado et al., 2010) (Figs. 1, 2). Third-passage hBMSCs were differentiated toward chondrocyte, adipocyte and osteoblast lineages, during 21 days using Commercial Chondrogenic, Adipogenic and Osteogenic Differentiation media (Lonza, Biowhittaker, Belgium). Differentiation was compared to cells cultured in DMEM with 20% foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation were evaluated by histochemistry, immunohistochemistry and molecular biology.

### *Cell culture on biomaterials*

After the hBMSCs were characterized, two pools of cells used in the multi-potential characterization were cultured on five different Col biomaterials (Opocrin S.p.A., Modena, Italy; Fig. 3A): C1C2 (types I and II Col), C1C2HS (types I and II Col plus heparan sulphate (HS)), C1C2CHS (types I and II Col plus chondroitin sulphate (CHS)), C1-OLH3 (type I Col plus low molecular weight heparin) and C1CHS (type I Col plus CHS). hBMSCs were cultured on the surface of  $1 \times 1$  cm<sup>2</sup> sponges (200,000 cells/cm<sup>2</sup>; Fig. 3B) for 30 days under normoxia conditions (humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>). Chondrogenesis was assessed by culturing hBMSCs in the presence of commercial hMSC chondrogenic induction medium (Lonza) with 10 ng/ml of human TGF $\beta$ -3 (Prospec-Tany Technogene Ltd.,

Rehovot, Israel). For negative controls, free-cell biomaterials were cultured in the same growth medium and for the same period of time. Culture media were changed 2-3 times a week. The culture supernatants from each change of culture medium were assayed to detect extracellular secretion of Col using a dye-binding method described below. After 30 days, 6 independent replicates of each biomaterial were collected for histological and immunohistochemical assays, real time quantitative PCR (q-PCR) analyses and electron microscope studies, as described below.

#### Chondrogenic differentiation on biomaterials

##### Histological analysis

Constructs with cells and free-cell biomaterials were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. To evaluate chondrogenesis, 4  $\mu$ m-thick paraffin sections of biomaterials were deparaffinized in xylol, rehydrated in a graded series of ethanol, and stained with hematoxylin and eosin (H-E), Masson's trichrome (MT), alcian blue (AB), Safranin O (SO) and Von Kossa (VK).

##### Immunohistochemical analysis

Paraffin sections (4  $\mu$ m-thick) were incubated with primary antibodies to detect the presence of Col I (monoclonal clone), II (monoclonal clone), and type X Col (Col X) (monoclonal clone), aggrecan (Agg C-20) (monoclonal clone), matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) (monoclonal clone) (all from Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (monoclonal clone) (Calbiochem, Madrid, Spain). The peroxidase/DAB ChemMate™ DAKO EnVision™ detection kit (Dako, Barcelona, Spain) was used to determine antigen-antibody interactions.

#### Histological and immunohistochemical evaluation of constructs

Samples were assessed by 3 independent observers using an optical microscope and the analisIS® software (version D; Olympus, Germany). For study groups using

H-E and MT staining, the percentage of cells in the total area of the biomaterial studied, the location (superficial or internal) of the cells in the biomaterial, and cell morphology and viability (by PCNA staining) were determined. The percentage of cells in the area of biomaterial studied was grouped by score: <1% (scored as 0), 1-24% (scored as 1), 25-49% (scored as 2), 50-74% (scored as 3) and 75-100% (scored as 4) (Sanjurjo-Rodríguez et al., 2014).

Histological and immunohistochemical results were expressed as semi-quantitative scores according to staining intensity: negative or absent (– or 0), weak (1+), moderate (2+), and strong (3+) (Sanjurjo-Rodríguez et al., 2014). To perform a global evaluation, staining and immunostaining values were calculated as the product of the categorized staining scores and percentage of cells; the values obtained were between 1 and 12: 1-4 lowest, 5-8 intermediate and 9-12 highest values (Table 1).

#### RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative Real Time PCR (q-PCR) analysis

Three constructs of each biomaterial were washed and sliced. The slices were placed in tubes with zirconium oxide grinding balls (Retsch, Haan, Germany) and frozen in liquid nitrogen. The tubes were then placed in a Mixer Mill MM200 (Retsch) to disintegrate the constructs. Total RNA was isolated from the homogenate using Trizol Reagent, following the manufacturer's protocol (Invitrogen, Barcelona, Spain). RNA was assessed for quantity at 260 nm using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific, Madrid, Spain). The A260/A280 ratio was calculated to assess quality and purity. Total RNA was processed by reverse transcriptase PCR (RT-PCR).

Before RT-PCR, total RNA was treated with DNase (Fermentas, Madrid, Spain) for complete removal of DNA contamination. The RT-PCR reaction was performed from total RNA following the manufacturer's instructions, using the SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

q-PCR analyses were performed on a LightCycler® 480 Instrument (Roche, Mannheim, Germany) using LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), following the manufacturer's instructions. The primers

**Table 1.** Summary of histological and immunohistochemical results.

	% cells	% PCNA	Staining intensity or metachromasia							
			AB	SO	VK	Col I	Col II	Col X	MMP13	Agg C20
C1C2	3	9	6	9	0	6	9	9	0	0
C1C2HS	4	12	4	12	4	12	12	4	0	0
C1C2CHS	4	4	8	8	0	4	12	4	4	0
C1-OLH3	3	0	0	6	0	0	3	0	3	0
C1CHS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Staining: AB, alcian blue; SO, safranin O; VK, Von Kossa. Immunostaining: PCNA, proliferating cell nuclear antigen; Col I, type I collagen; Col II, type II collagen; Col X, type X collagen; MMP13, matrix metalloproteinase 13; Agg C20, aggrecan.

were purchased from Roche. TATA binding protein (*TBP*) (Roche) was used as the internal control housekeeping gene to normalize the amount of target cDNA. Primers of SRY (sex determining region Y), box 9 (*SOX9*), Agg (*AGG*) and Col II alpha 1 (*COLII*) genes, were used to evaluate chondrogenesis. To detect differentiation towards fibroblasts, Col I (*COLI*) primers were used. To detect hypertrophy, type X Col (*COLX*) was tested.

Data analysis was performed in triplicate using LightCycler 480 Relative Quantification software (Roche). Relative Expression Levels (REL) were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

#### Electron microscope analysis

Samples for electron microscopy were processed in the Servizo de Apoio á Investigación at the University of A Coruña (SAI-UDC).

#### Scanning electron microscopy

Constructs with cells and free-cell biomaterials were fixed in 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer. After dehydration in a graded series of ethanol, the samples were fixed in osmium tetroxide. Samples were critical point dried by flooding with liquid CO<sub>2</sub> in a Bal-Tec CPD 030 (Balzers, Liechtenstein, Germany) and gold-sputtered with a coater Bal-Tec SCD 004 (Balzers). Samples were observed using a scanning electron microscope (SEM) JSM 6400 (JEOL, Tokyo, Japan).

#### Transmission electron microscopy

Constructs with cells and free-cell biomaterials were

fixed in 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer. Biomaterials were dehydrated in a graded series of acetone and fixed in osmium tetroxide. Samples were embedded in Spurr (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) and 60 nm thick Spurr sections were observed by TEM Jeol JEM 1010 (JEOL).

#### Collagen assay

The concentration of total Col secreted by the cells was determined in the supernatants at each change of culture medium, using a dye-binding method (Sircol™ Collagen Assay; Biocolor, City, UK) for analysis of acid and pepsin-soluble collagens, following the manufacturer's protocol. Supernatants from biomaterials cultured without cells were utilized as negative controls to detect any Col originating from biomaterial degradation.

#### Statistical analysis

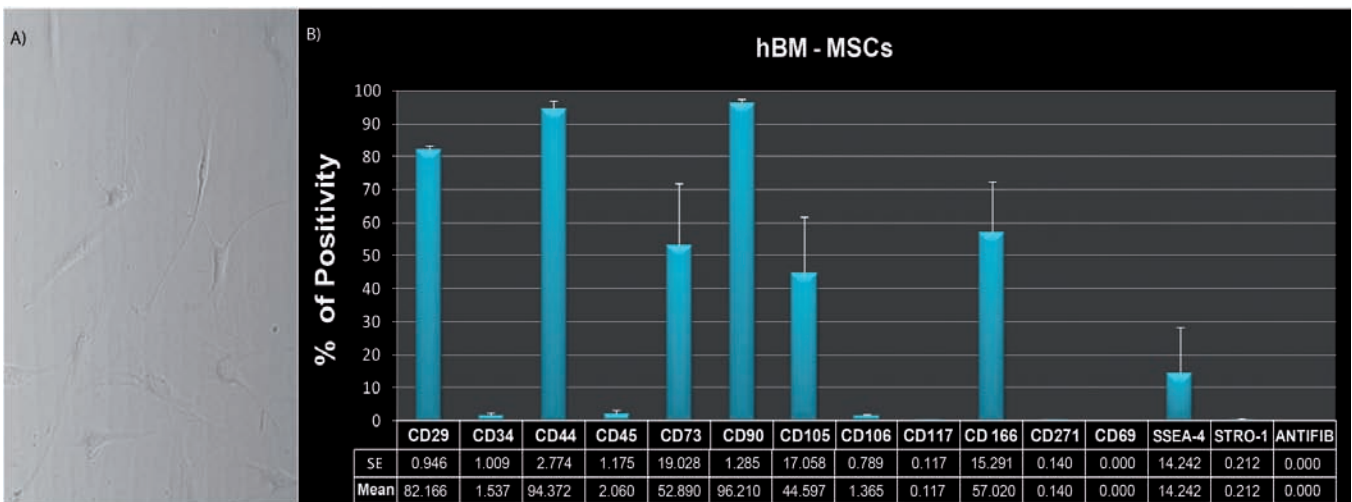
All statistical analyses were performed with SPSS 18.0 software for Windows, using non-parametric tests. p-values <0.05 were considered to be statistically significant. Results were expressed as the mean ± standard error (mean ± SE).

## Results

#### Evaluation of the extracellular matrix

##### Proteoglycan detection

C1C2 and C1C2HS constructs showed the highest metachromasia with SO staining, indicating the presence of sulphated GAGs (Fig. 4, Table 1). C1C2CHS and C1-OLH3 constructs were highly stained, but those of



**Fig. 1.** A. Image of human bone-marrow mesenchymal stromal cells (hBM-MSCs) in culture with their characteristic fibroblastic morphology. B. Percentage of positivity (mean and standard error (SE)) obtained by flow cytometry for markers characteristic of mesenchymal cells (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD166, CD271, CD69) embryonic cells (SSEA-4, STRO-1), and hematopoietic cells (CD34, CD45), and antifibroblast. A, x 200



C1CHS were not (Fig. 4, Table 1). Biomaterial fibers were orthochromatically stained (Fig. 4, Table 1). AB staining showed the bigger area of staining in the ECM of cells grown on C1C2 and C1C2CHS (Fig. 4, Table 1), indicating the presence of high amounts of PG. As seen in Fig. 4, the biomaterial fibers stained with higher intensity than the ECM. C1C2HS showed less staining intensity and C1CHS and C1-OLH3 did not stain (Fig. 4, Table 1). Agg immunostaining was negative in all constructs (Fig. 4, Table 1).

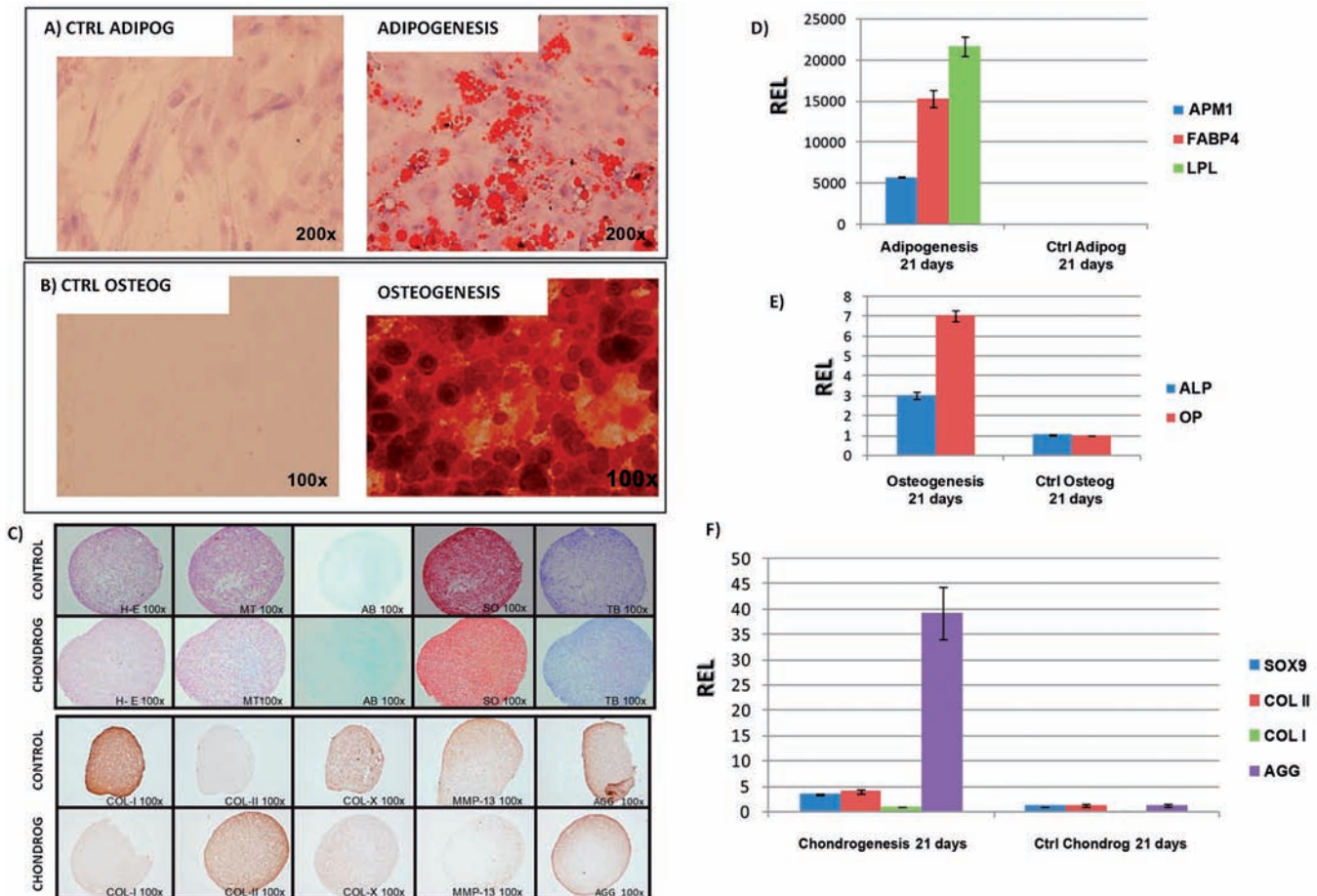
Free-cell controls were negative for AB, SO and Agg (Fig. 5).

### Collagen assays

After measuring the total amount of Col liberated to supernatants from biomaterials cultured without cells, secreted-total Col ( $\mu\text{g}$ ) liberated by cells was detected in

all constructs (Fig. 6A). In C1C2, C1C2HS and C1-OLH3 constructs, cells progressively liberated Col up to a maximum and then decreased progressively. On day 11, C1C2, C1C2HS and C1-OLH3 had peaks of  $13.99 \pm 4.77 \mu\text{g}$ ,  $11.10 \pm 7.50 \mu\text{g}$  and  $38.10 \pm 6.13 \mu\text{g}$ , respectively (Fig. 6A). C1C2CHS was seen to have two peaks, one on day 4 ( $17.16 \pm 12.87 \mu\text{g}$ ) and, following a few days of lower concentration, another one at day 21 ( $13.90 \pm 3.93 \mu\text{g}$ ). C1CHS also had two peaks at day 4 ( $72.22 \pm 11.47 \mu\text{g}$ ) and day 14 ( $20.50 \pm 3.42 \mu\text{g}$ ) (Fig. 6A). Significant differences in total released collagen between biomaterials existed at days 4 ( $p=0.002$ ), 11 ( $p=0.002$ ), 14 ( $p=0.046$ ) and 21 ( $p=0.007$ ). Showing the highest Col concentration were the following: at day 4 and day 14, C1CHS ( $72.22 \pm 11.47 \mu\text{g}$  and  $20.50 \pm 3.42 \mu\text{g}$ , respectively); at day 11, C1-OLH3 ( $38.10 \pm 6.13 \mu\text{g}$ ); and at day 21, C1C2CHS ( $13.90 \pm 3.93 \mu\text{g}$ ) (Fig. 6A).

Immunohistochemistry revealed that ECMs of C1C2



**Fig. 2.** Multipotential characterization. **A.** Images of adipogenic differentiation and control cultures (Ctrl Adipog) stained with oil red O. **B.** Images of osteogenic and control cultures (Ctrl Osteog) stained with alizarin red. **C.** Images of histological and immunohistochemistry stainings from chondrogenic differentiation (Chondrog) and control cultures (Control). **D.** REL of adipogenic characteristic genes in adipogenic differentiation and control cultures. **E.** REL of osteogenic characteristic genes in osteogenic differentiation and control cultures. **F.** REL of characteristic (COLII, SOX9, AGG) and non-characteristic (COLI) chondrocytic genes, in chondrogenic differentiation and control cultures (Ctrl Chondrog).

and C1C2HS constructs were intensely stained and cells of C1C2CHS had intracytoplasmic staining for Col I (Fig. 6B, Table 1). Cells grown on C1-OLH3 and C1CHS constructs were negative for Col I with immunostaining (Fig. 6B, Table 1). The ECMs of all constructs, except C1CHS, were positive for Col II immunostaining; C1C2, C1C2HS and C1C2CHS constructs being the most intensely stained (Fig. 6B, Table 1) and C1-OLH3 the least. Both cells and the ECM of C1C2 constructs were stained intensely for Col X (Fig. 6B, Table 1) while ECMs in C1C2HS and C1C2CHS stained weakly (Fig. 6B, Table 1). Cells grown on C1-OLH3 and C1CHS were negative for Col X immunostaining (Fig. 6, Table 1). Free-cell controls were weakly positive for Col I and Col II, except C1C2 that showed more positivity for Col II (Fig. 5). For Col X, all free-cell biomaterials presented positivity.

#### Evaluation of cellular element

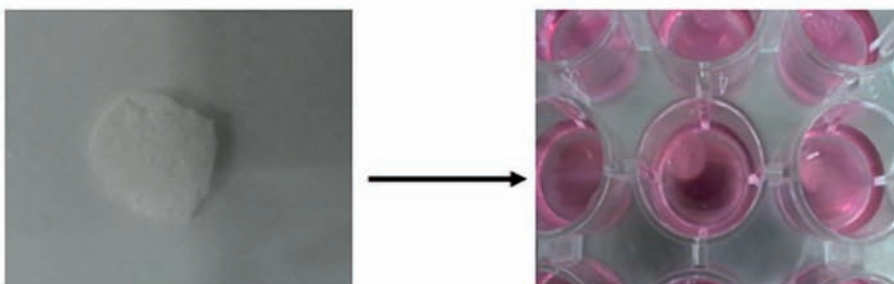
##### Cell morphology assays

H-E and MT staining showed that the percentage of cells in the area of analysed biomaterial was higher than 50% in C1C2 and C1-OLH3 and higher than 75% in C1C2HS and C1C2CHS biomaterials, while that of C1CHS was below 1% (Fig. 7, Table 1). hBMSCs were able to grow on the surface and inside all biomaterials except C1CHS, where they grew only on the surface. In C1C2, C1C2HS, C1C2CHS and C1-OLH3 biomaterials, cell aggregates with surrounding ECM and consequent biomaterial degradation were found, except in C1-OLH3 (Fig. 7). With MT staining, large amounts of Col were found in the ECM, secreted by cells grown on C1C2, C1C2HS, C1C2CHS, but lesser amounts of Col with C1-

**A**

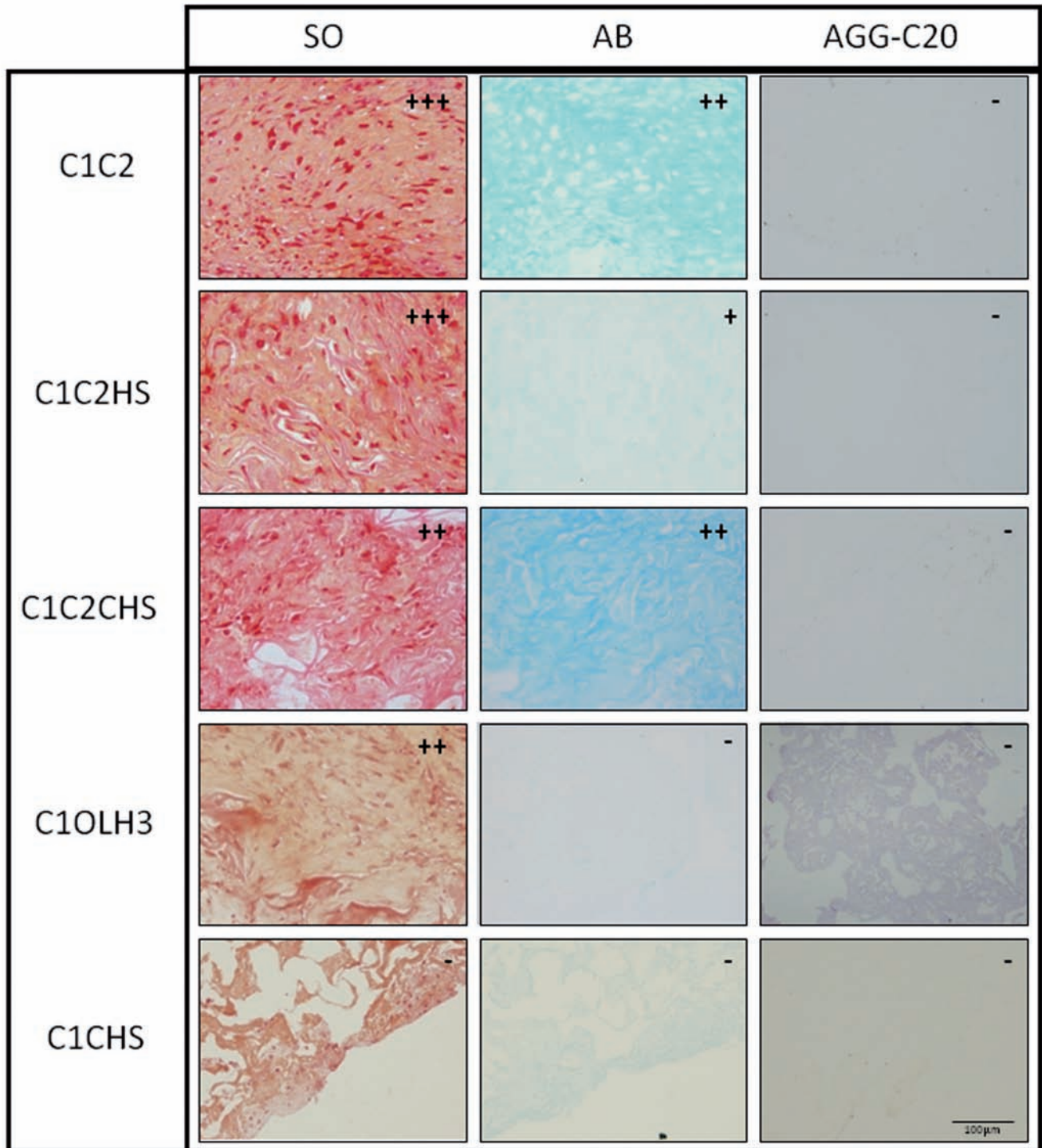
Biomaterials	Composition					Thickness
	Type I Col	Type II Col	HS	CHS	Heparin	
C1C2	X	X				1 mm
C1C2HS	X	X	X			
C1C2CHS	X	X		X		
C1-OLH3	X				X	
C1CHS	X			X		

**B**



**Fig. 3. A.** Summary table of biomaterial composition and characteristics. **B.** Images of sponges before and after culture.





**Fig. 4.** Images of proteoglycans (PGs) stained by safranin O (SO; left column) and alcian blue (AB; middle column) histological stains, and aggrecan (Agg-C20; right column) immunostaining. From top to bottom the different types of scaffolds are shown. Semi-quantitative scores according to staining intensity or metachromasy: negative or absent (– or 0), weak (1+), moderate (2+), and strong (3+). Scale bar: 100 µm.

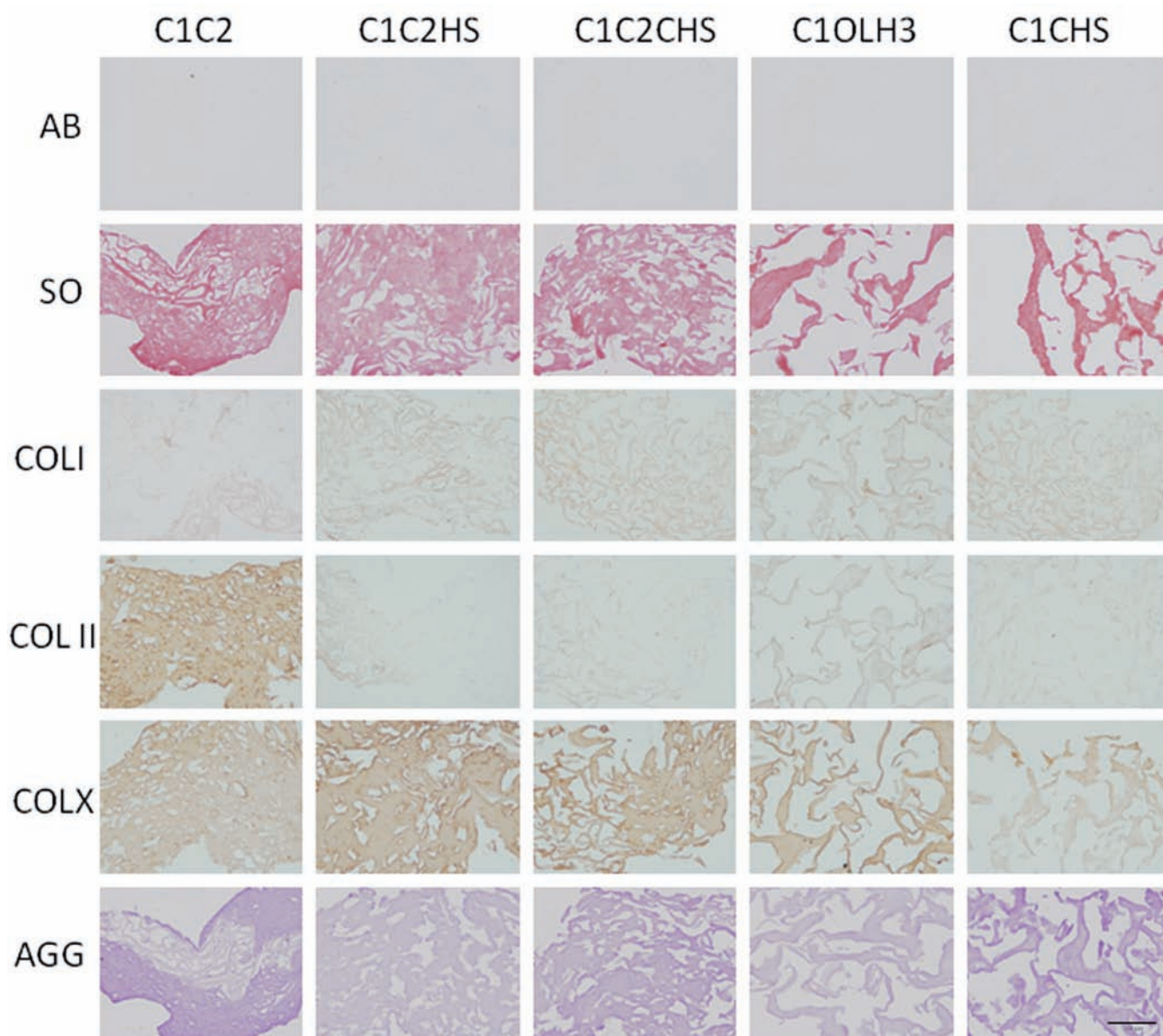
OLH3 (Fig. 7). The MT staining of C1CHS showed only biomaterial positivity. The fibers of all the biomaterials were stained more intensely than the ECM (Fig. 7).

#### Cell proliferation analyses

PCNA immunostaining detected many proliferative cells in all biomaterials, except C1CHS (Fig. 7, Table 1). C1C2 and C1C2HS had the most intense staining (Fig. 7, Table 1).

#### Detection of hypertrophy markers

Cells grown on the constructs were not positive for MMP-13 immunostaining, except for C1C2CHS and C1-OLH3, which showed weak intracytoplasmic positivity (Fig. 8, Table 1). Cells grown on all biomaterials were negative for VK staining except C1C2HS, which showed slight positivity, indicating no mineralization in all constructs (Fig. 8, Table 1). Col X was negative in C1-OLH3, C1CHS and in cells of



**Fig. 5.** Images of free-cell scaffolds stainings and immunostainings: AB, alcian blue; SO, safranin O; Col I, type I collagen; Col II, type II collagen; Col X, type X collagen; Agg C20, aggrecan. Scale bar: 100  $\mu$ m



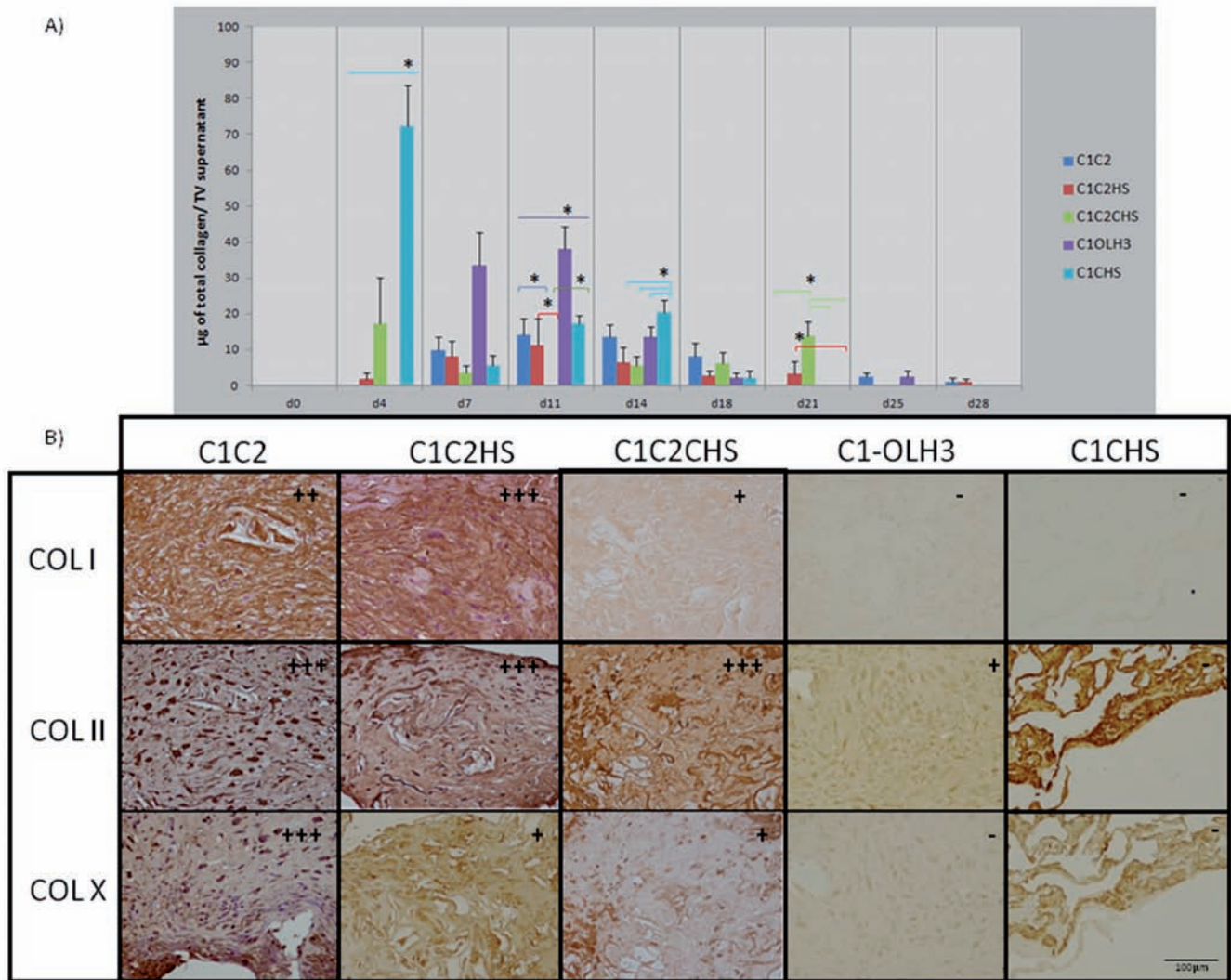
# MSCs and collagen for cartilage repair

C1C2HS and C1C2CHS. On the other hand, C1C2 was intensely stained for Col X (Fig. 6B, Table 1).

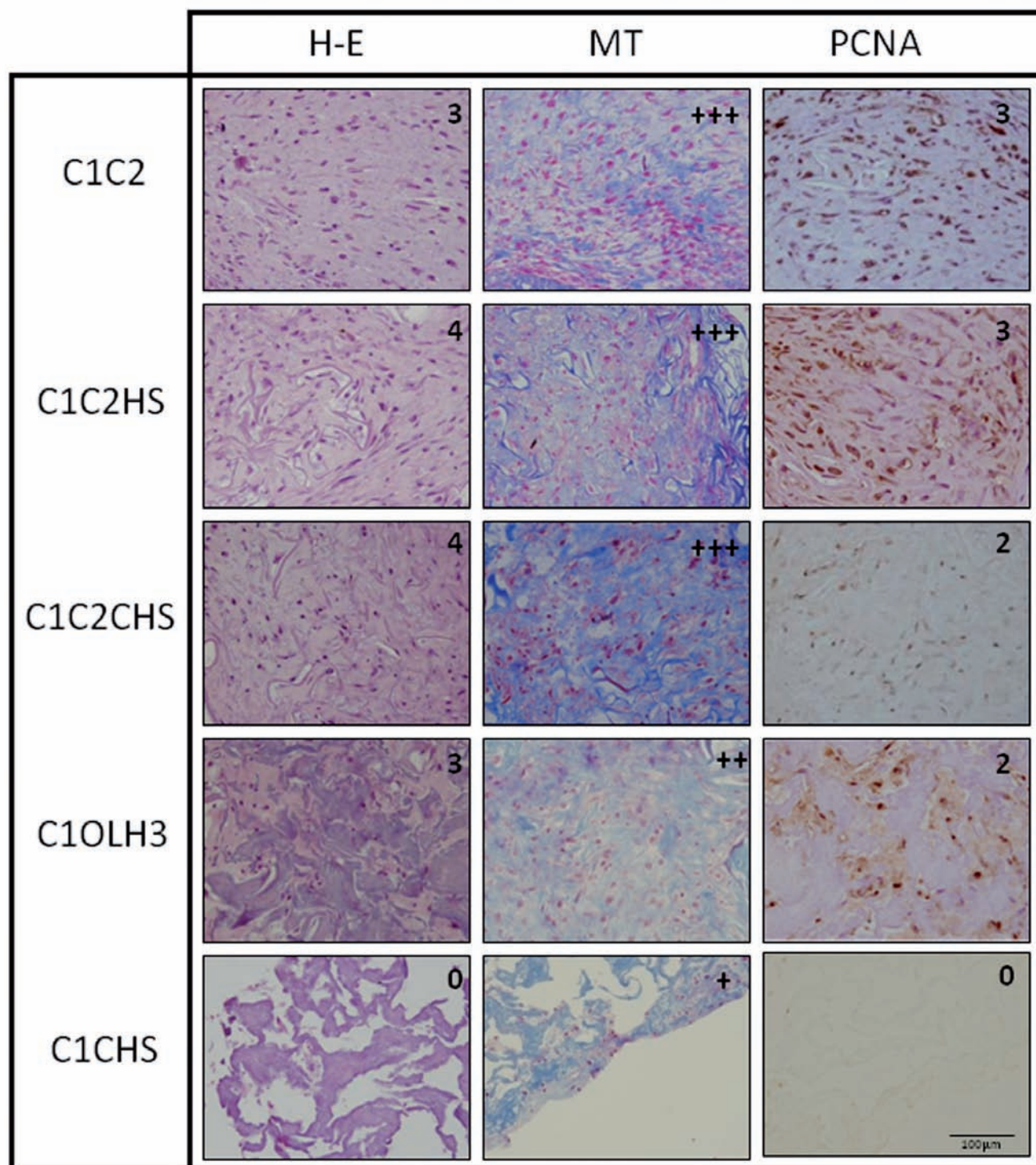
## Gene expression studies

Significant differences were found between the biomaterials for expression of the typical chondrogenic genes, *SOX9* ( $p=0.039$ ) and *COLII* ( $p=0.043$ ). Cells grown on C1CHS biomaterial expressed the lowest REL for *SOX9* ( $0.089\pm0.001$ ) and the highest ( $5.210\pm1.050$ ) for C1C2HS (Fig. 9A). Cells grown on C1CHS also expressed the lowest REL for *COLII* ( $0.155\pm0.007$ ), while cells grown on C1C2 ( $6.130\pm0.000$ ) and C1C2HS ( $5.670\pm0.000$ ) showed the highest REL for *COLII* (Fig.

9A). The highest REL for the *AGG* gene was found in cells grown on C1C2HS ( $5.974\pm1.004$ ) and the lowest was seen on C1-OLH3 ( $0.000\pm0.000$ ) and C1CHS ( $0.000\pm0.000$ ), but there were no significant differences between biomaterials ( $p=0.075$ ) (Fig. 9A). However, there were significant differences between biomaterials in the REL of the *COLI* gene ( $p=0.021$ ). Highest expression of *COLI* was found in cells for C1C2HS ( $0.805\pm0.127$ ) and lowest in cells for C1-OLH3 ( $0.000\pm0.000$ ) (Fig. 9A). Significant differences were found for *COLX* ( $p=0.008$ ), REL were higher for C1C2 ( $162.488\pm12.365$ ) than for C1C2HS ( $2.043\pm0.071$ ) and C1C2CHS ( $1.151\pm0.150$ ). *COLX* expression was not found for C1-OLH3 and C1CHS.

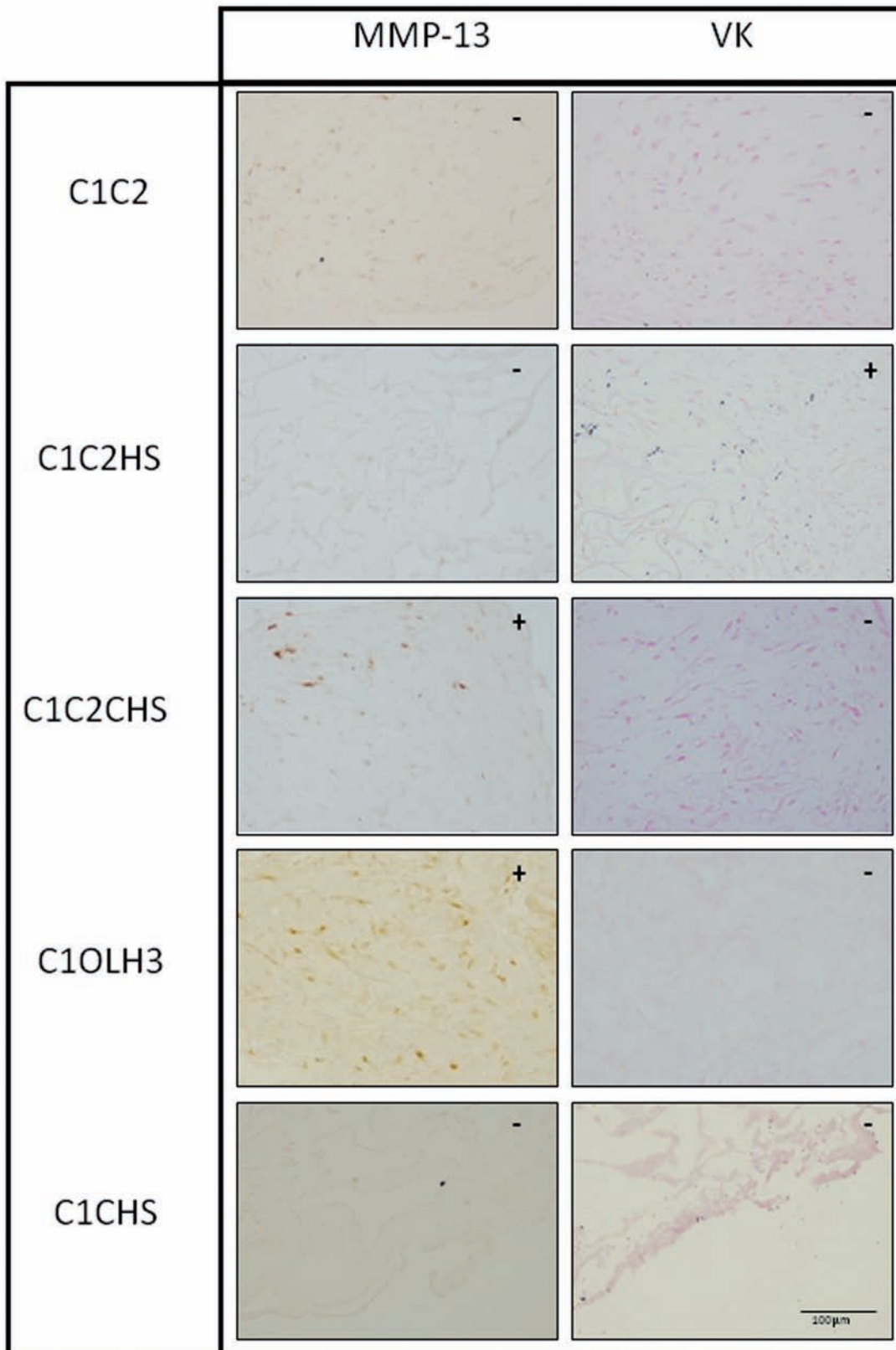


**Fig. 6. A.** Mean of total collagen ( $\mu\text{g}$ ) content measured in the total culture media supernatant volume (TV), over days in culture of the different biomaterial constructs. \* Statistical differences. **B.** Images of Col I (top row), Col II (middle row) and Col X (bottom row) immunohistochemical staining in all the scaffolds (from left to right: the different types of scaffolds). Semi-quantitative scores according to immunostaining intensity: negative or absent ( $-$  or  $0$ ), weak ( $1+$ ), moderate ( $2+$ ), and strong ( $3+$ ). Scale bar:  $100\ \mu\text{m}$ .



**Fig. 7.** Images obtained from the different constructs by histological and immunohistochemical staining. From top to bottom the different types of scaffolds are shown. From left to right, hematoxylin and eosin (H-E; left column) and Masson's trichrome (MT, middle column) histological stainings and proliferating cell nuclear antigen (PCNA; right column) immunostaining are shown. Semi-quantitative scores according to staining intensity: negative or absent (– or 0), weak (1+), moderate (2+), and strong (3+). Percentage of cells and PCNA immunostaining: <1% (0), 1-24% (1), 25-49% (2), 50-74% (3) and 75-100% (scored as 4). Scale bar: 100  $\mu$ m.





**Fig. 8.** Images obtained from the different constructs by matrix metalloproteinase 13 immunostaining (MMP-13, left column) and Von Kossa staining (VK, right column). Semi-quantitative scores according to immunostaining intensity: negative or absent (– or 0), weak (1+), moderate (2+), and strong (3+). Scale bar: 100  $\mu$ m

### Morphometric and ultrastructural evaluations

Morphometric analysis performed using SEM on the constructs showed that cells had variable morphologies in all the biomaterials.

Accumulations of roughly fused spherical material appeared in the extracellular space in all the constructs (Fig. 10) and small spheres that did not appear in the respective controls often appeared near the cells (Fig. 10A,C,E,H-J,L-O). These accumulations were electron-dense because of their high osmium tetroxide affinity, indicating high lipid content. The electron-dense accumulations are also present in TEM. This may indicate that the vesicles of extracellular material were actively secreted by cells.

In C1C2 cells were flattened with short prolongations (Fig. 10B). C1C2CHS also presented flattened cells but with large prolongations from the cellular wall (Fig. 10G,H). In the other biomaterials cells were rounded and only in C1OLH3 did we find large prolongations (Fig. 10K).

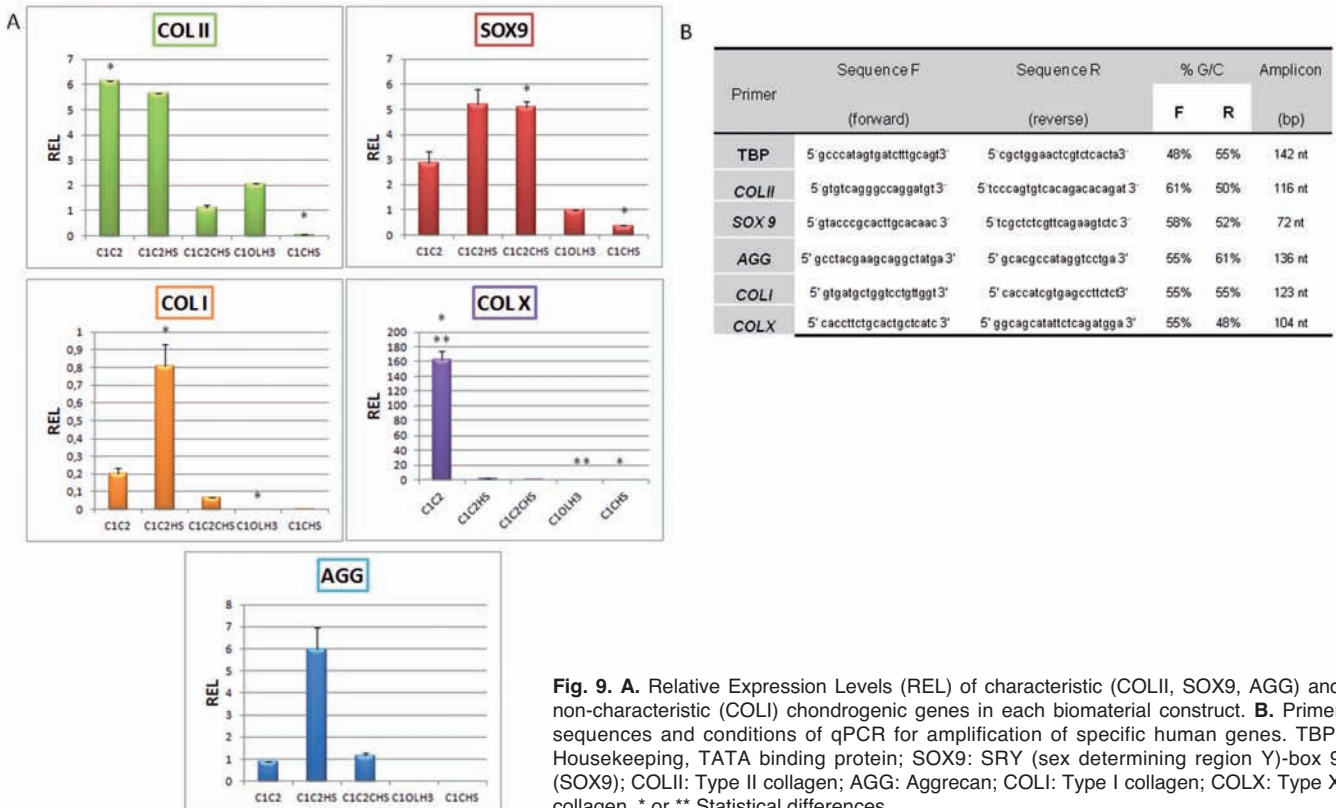
Ultrastructural analysis of the constructs using TEM showed cells throughout all biomaterials and that some parts of all biomaterials were degraded. Cells were proliferative, as seen in Fig. 11, and were oval shaped. Cells showed abundant intracellular organelles like

mitochondria (Fig. 11A,D,E,I-M), indicating high cell activity. Few small prolongations were seen around cells (Fig. 11A,D,E,K-M), and inside cells some electron-dense granules were found (Fig. 11A,B,D,E,G,H,K,Q). Inside the biomaterials, highly vacuolated apoptotic cells (Fig. 11AP) and cellular debris containing many mitochondria and electron-dense granules (Fig. 11B,F,P) were found.

Inside the C1C2 construct, cells were found between biomaterial fibers (Fig. 11A,B,C,Sc) and ECM was not detected. Oval-shaped cells in the C1C2HS construct were surrounded by biomaterial (Fig. 11D-F,Sc), and ECM was not detected.

Similar to C1C2, cells in C1C2HS contained abundant secretions (Fig. 11D), intracytoplasmic electron-dense granules (Fig. 11D-F) and a few small prolongations (Fig. 11D,E). In these cells, mitochondria were fewer and vacuoles more patent (Fig. 11D,E). Cellular debris was also present (Fig. 11F).

Inside C1C2CHS, cells were found closely attached to the biomaterial fibers (Fig. 11G,H,Sc); these cells showed an irregular shape and much ECM. In this ECM we observed Col fibers in bundles (Fig. 11G) running in various planes. The cells contained many electron-dense granules (Fig. 11G,H) and organelles (Fig. 11I,J), particularly mitochondria, and an oval/rounded cellular



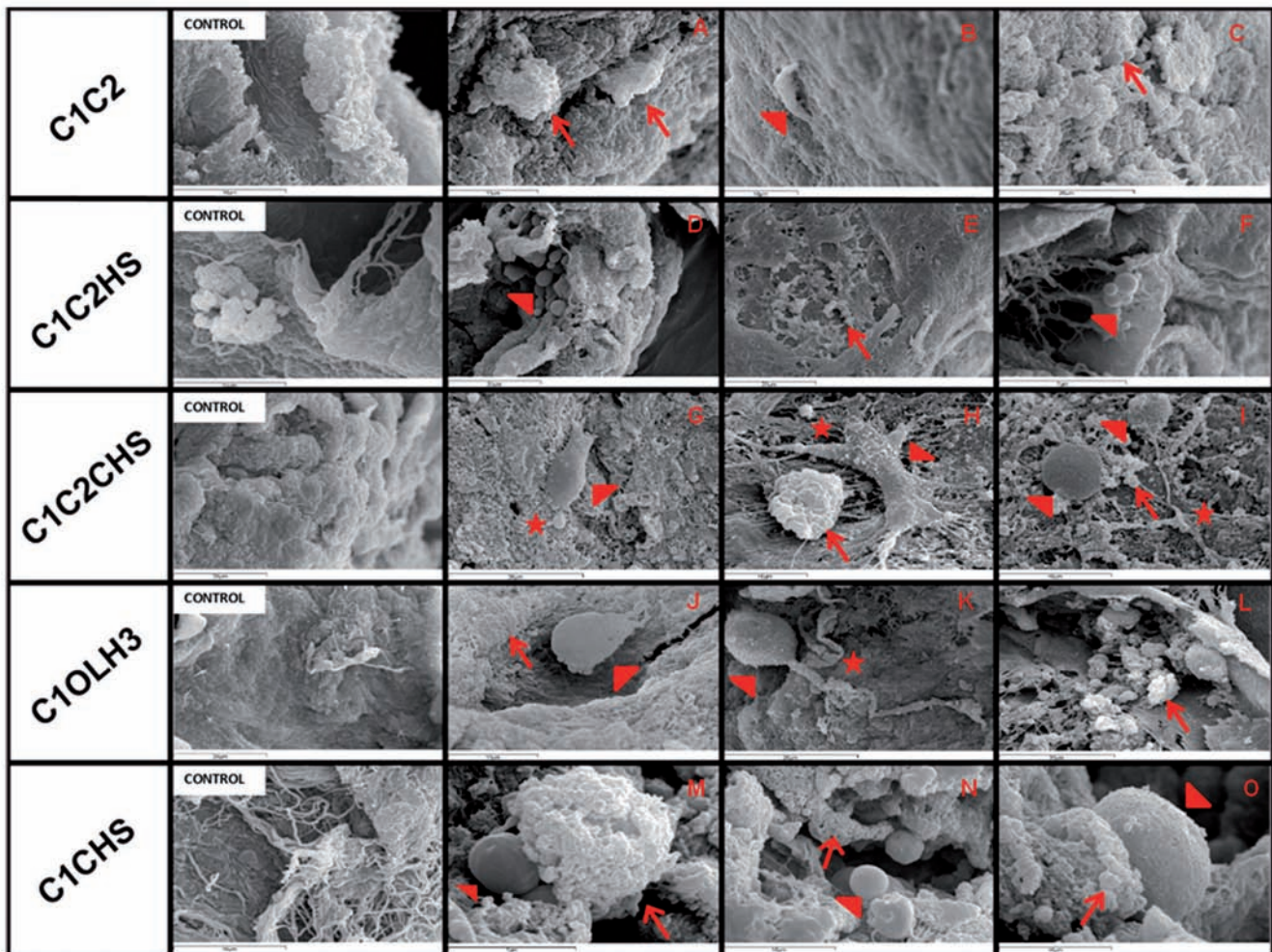
nucleus (Fig. 11Nuc) with a prominent nucleolus. There were no apparent prolongations seen around the cells and only a little extracellular material (Fig. 11G).

The C1-OLH3 constructs had cells with different morphologies, from elongated to round (Fig. 11K-M) and no ECM. These cells were seen with no biomaterial surrounding them; proliferating cells were also seen (Fig. 11K). In the cytoplasm there were many vesicles containing material (Fig. 11L,M) and electron-dense granules (Fig. 11K). These cells possessed many prolongations (Fig. 11K-M) and no extruded material was seen. Inside the C1CHS construct we found apoptotic cells (Fig. 11P,AP) and long fibroblast-like cells (Fig. 11N,Q), closely attached to the biomaterial fibers (Fig. 11Sc). These cells contained large numbers of electron-dense granules in the cytoplasm (Fig. 11Q) and no extruded material or ECM was visible.

## Discussion

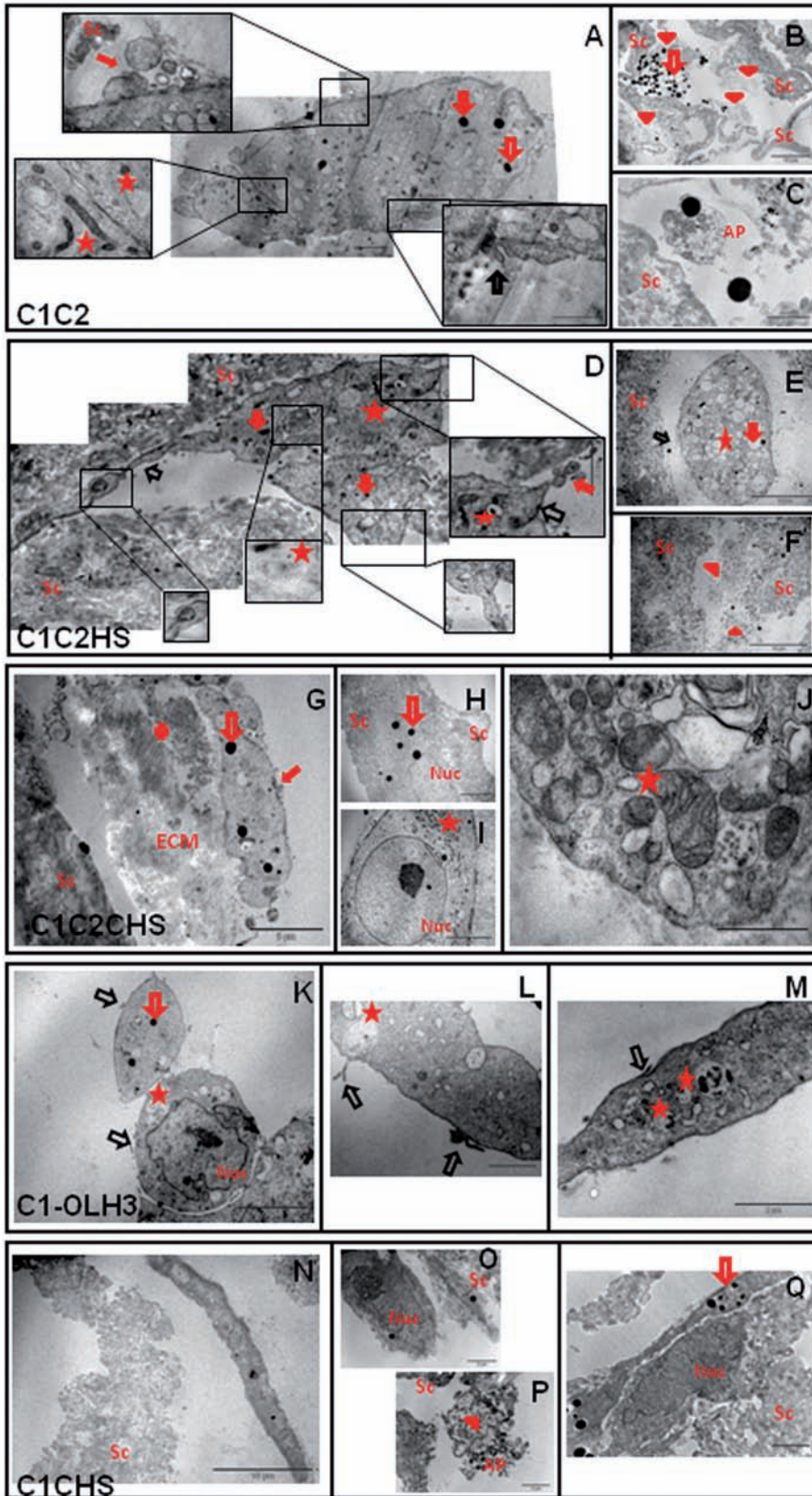
Since its emergence, tissue engineering has evolved as a multidisciplinary field with an overall aim of developing biological substitutes to restore, replace or regenerate defective tissues (Chan and Leong, 2008). There is great promise for the generation of functional cartilage substitutes using engineered tissue constructs *in vitro* for subsequent implantation *in vivo*. Nonetheless, constructs currently obtained by tissue engineering have key challenges remaining to be addressed (Tuli et al., 2003).

Stem cells, when used in combination with proper scaffolds and appropriate growth factors, could have a great impact on cartilage repair (Chen et al., 2011). According to the international guidelines (Dominici et al., 2006) BMSCs should be all (>95%) positive for



**Fig. 10.** Images obtained from the different constructs with cells and free-cell scaffolds (control) by scanning electron microscopy (SEM). From top to bottom the different types of scaffolds are shown. Arrowhead: cells; star: prolongations from the cellular wall; arrow: spheres of extracellular material. Scale bars: C1C2, C1C2HS and C1CHS controls, and A, B, H, I, J, N, O, 10  $\mu$ m; C1C2CHS and C1-OLH3 controls, and C, D, E, G, K, 20  $\mu$ m; F and M, 7  $\mu$ m; L, 30  $\mu$ m.





**Fig. 11.** Images obtained by transmission electron microscopy (TEM) from the different biomaterial constructs. The different scaffolds are shown from top to bottom. AP: highly vacuolated apoptotic cells; arrowheads: cellular debris; cross: fibers of collagen; empty black arrow: prolongations; empty red arrow: electron-dense granules; Sc: fibers of biomaterial; Nuc: nucleus; ECM: extracellular matrix. Scale bars: A) 2  $\mu$ m (the main image) and 1  $\mu$ m, 500 nm and 1  $\mu$ m (details from upper-left to lower-right, respectively); D) 2  $\mu$ m (the main image) and 500 nm, 500nm, 2  $\mu$ m and 2  $\mu$ m (details from lower-left to upper-right); B, E, F, N 10  $\mu$ m; G, H, I, K 5  $\mu$ m; C, L, M, O, P, Q 2  $\mu$ m; J 1  $\mu$ m.



CD73 and CD105. In this study even when CD73 and CD105 are not >95% positive, these cells fulfill all the other requirements (positive for CD90, not positive for CD34 and CD45 and capacity for multipotent differentiation). This difference could be due to the age of donors ( $74.66 \pm 10.25$  and  $76.25 \pm 2.87$ ) and that all of them presented severe OA (hip replacements because of stage 4 -OA). In our previous works, we found differences in the positivity of surface markers between healthy and OA cells (from different joint tissues) (Hermida-Gómez et al., 2011; Cicione et al., 2013).

BMSCs can be induced toward chondrogenic differentiation for cartilage tissue engineering purposes in a variety of 3D culture environments (Markway et al., 2010; Ragetly et al., 2010), facilitated by administering TGF $\beta$  (Lisignoli et al., 2005; Hu et al., 2009; Ragetly et al., 2010). *In vivo*, growth factors of the TGF $\beta$  superfamily are effective for inducing chondrogenesis (Hunziker, 2002). In our study, the commercial chondrogenic medium included TGF $\beta$ -3.

Several studies have obtained a cartilage-like ECM and cell phenotype using chondrocytes and cartilage-derived matrix (Cheng et al., 2011), Col I (De Franceschi et al., 2005; Negri et al., 2007), fibrin glue gel (Scotti et al., 2010), Col I and Col III (Ehlers et al., 1999) and hyaluronan benzyl-ester scaffolds (Grigolo, et al., 2002b). Other studies have obtained satisfying results with MSCs using nanofibrous poly L-lactic acid (Hu et al., 2009), chitosan (Ragetly et al., 2010), alginate and hyaluronan (Tritz-Schiavi et al., 2010) and hyaluronan benzyl-ester scaffolds (Lisignoli et al., 2005). In our study we chose biomaterials consisting of typical cartilage ECM compounds: Col and PGs or GAGs from natural sources.

The use of natural compounds as biomaterials provides an advantage over semi-synthetic scaffolds because of their limited intrinsic bioactivity (Schagemann et al., 2013). Col is a biodegradable material that can be reconstituted into fibrous structures simulating the native ECM in tissues (Chan and Leong, 2008), like the sponges that we used in this work. The use of biomaterials that mimic native ECM should be advantageous in *in vivo* studies. Xenogenic natural biomaterials could cause immunological rejection when implanted (Tuli et al., 2003; Chan and Leong, 2008), but Col possesses good biocompatibility (Chan and Leong, 2008) and cytocompatibility (Xu et al., 2012). Moreover, the use of xenogenic Col avoids viral contamination (De Franceschi et al., 2005) and its degradation produces non-toxic products (Hunziker, 2002). On the other hand, the use of CHS in biomaterials promotes proliferation (Ko et al., 2009), regulates cartilage-specific genes and the expression of the chondrocyte phenotype, and prevents MSCs from further differentiating into a hypertrophic phenotype (Lee et al., 2006; Varghese et al., 2008; Kagita et al., 2010). Scaffolds for tissue engineering should be capable of facilitating infiltration, attachment, proliferation and cell differentiation (Tuli et al., 2003). Wang et al., (2012) suggested that

biomaterials composed of Col I improve hydrophilicity of the scaffold and allow better cell adhesion, proliferation activity and differentiation. In our experiments, hBMSCs showed improved capacity for cell attachment and synthesis of ECM in biomaterials composed of both Col I and II (C1C2, C1C2HS, C1C2CHS) than in biomaterials composed only of Col I (C1OLHS, C1CHS), which had larger pore size. Scaffolds should be porous enough for efficient nutrient and metabolite transport (Negri et al., 2007; Chan and Leong, 2008; Kock et al., 2012). Several studies have found inhomogeneous proliferation, ECM deposition or differentiation between central and peripheral parts of scaffolds (Lee et al., 2006; Markway et al., 2010; Ragetly et al., 2010; Scotti et al., 2010; Zhang et al., 2012) when scaffold porosity was unsuitable. Indeed, we observed homogeneous growth only in biomaterials composed of both types of Col (C1C2, C1C2HS, C1C2CHS) and that MSCs could easily infiltrate, attach, proliferate and synthesize ECM in these scaffolds.

We observed COL II in C1C2, C1C2HS and C1C2CHS, with COL I being downregulated only in C1C2CHS. Increased COL I expression has often been seen to be closely related to chondrogenic differentiation of MSCs *in vitro* and to pre-chondrogenic MSCs (Grigolo, et al., 2002a; Lopez-Ruiz et al., 2013). The same phenomenon occurs with Col X, whose expression increases during *in vitro* MSC culture (Kock et al., 2012). The presence of both Col I and X may indicate the presence of undifferentiated MSCs inside the construct, mixed with differentiated chondrocyte-like cells. It may be that during chondrogenesis cells do not stop proliferating at the time of cell differentiation (Lisignoli et al., 2005). The highest presence of Col I was observed in C1C2HS, suggesting that the cells were in an early state of differentiation.

Both immunohistochemistry and molecular biology confirmed higher expression of Col X on C1C2 than in biomaterials composed of HS, CHS or heparin. Several authors found that the use of CHS for cartilage engineering prevents hypertrophy (Chen et al., 2015). On the other hand, chondrogenic hypertrophy of MSC could be avoided, with specific strategies at protein/gene level, when cultured in expansion or chondrogenic differentiation medium (Chen et al., 2015). For example, using FGF2 and WNT3A in MSC expansion medium in combination with WNT inhibition during differentiation (Narcisi et al., 2015), using specific PTHrP isoforms in chondrogenic differentiation medium (Lee and Im, 2012) or via TGF $\beta$ /Smad signaling modulation (Hellingman et al., 2011).

The early state of differentiation is also in agreement with SEM and TEM analyses in which we could see cells with rounded/oval shapes (Tew et al., 2008; Hu et al., 2009; Cheng et al., 2011) and many mitochondria, similar to mature chondrocytes (Fuss et al., 2000; Negri et al., 2007), as well as flattened cells resembling MSCs. The structure and composition of articular cartilage varies according to its distance from the surface, and

chondrocytes from the different zones differ in size, shape and metabolic activity (Newman, 1998). Cartilage electron microscopy studies (Poole et al., 1987) showed chondrocytes with a flattened discoid shape and no clear evidence of a pericellular capsule in superficial layers of cartilage. In the C1C2CHS constructs that we tested, we observed Col horizontal fibers by TEM, similar to the superficial zone of cartilage (Khoshgoftar et al., 2011). The presence of some undifferentiated MSCs or chondrocyte-like cells without a depth-dependent organization could be an asset for cartilage engineering, because an immature engineered neotissue is able to mature into normal tissue when implanted into a joint (Pabbruwe et al., 2009). Because cellular phenotype and ECM vary in the cartilage zones (Newman, 1998), the constructs, once implanted, influence the metabolism of host cells (Negri et al., 2007), and the quality of the tissue-engineered cartilage (Fuentes-Boquete et al., 2008). Also, the movement and mechanical loads of the host joint are essential for development and maintenance of normal articular cartilage structure (Khoshgoftar et al., 2011). Continuous passive motion has been reported to encourage healing of full-thickness defects, and the regenerated tissue closely resembles hyaline cartilage (Newman, 1998). Furthermore, tissue engineering studies using depth-dependent scaffold properties or cell sources to create a depth-dependent structure have shown limited success (Khoshgoftar et al., 2011).

Col II is usually used as a marker for hyaline cartilage (Negri et al., 2007) and a PG-rich ECM is also a hallmark of chondrogenesis (Tew et al., 2008). Many tissue engineering methodologies produce cartilage-like neotissues with macromolecular components similar to those of native cartilage ECM. A major challenge is to produce constructs having biochemical, biomechanical and structural properties functionally equivalent to *in vivo* cartilage (Lee et al., 2010b).

The expression of Agg varies widely between individual patients, suggesting that this PG is unsuitable as a marker for chondrocyte differentiation (Grigolo, et al., 2002b). Although C1C2, C1C2HS and C1C2CHS were strongly positive for PGs in our study, we did not find Agg expression at the protein level, although it was present at the gene level.

Several studies suggest that adding exogenous Col II to MSCs culture is better than adding Col I. Chen et al. (2005) concluded that Col II in the culture medium allows GAG synthesis but Col I decreases the Agg, Sox 9 and Col II levels. Furthermore, Wong et al. (2010) found more deposition of GAG in chondrocyte cultures, in response to addition of Col II to the culture medium. In this study, the hBMSCs on biomaterials composed of Col II presented better GAG synthesis than hBMSCs on Col I biomaterials. However, the presence of Col I in these biomaterials can be downregulating the Agg expression, whereas Sox 9 and Col II is not affected.

Scaffold pore size is also an important factor in preventing the newly synthesized proteins and PGs from escaping (Mouw et al., 2005). The larger amounts of

secreted-Col detected in C1-OLH3 and C1CHS culture supernatants may be explained by this phenomenon. Several studies have found that the use of CHS in biomaterials promotes the secretion of Col II (He et al., 2012); this agrees with the results of our Col assays in which we found more peaks of total Col released in CHS biomaterials than in the others. We found two maximum peaks of released Col concentration in biomaterials composed of CHS, but only one in the other biomaterials. Finding the first peak in CHS biomaterials at the beginning of culture indicates that CHS provokes an immediate secretion of ECM components. Histologically, we found Col II in the ECM from C1C2, C1C2HS and C1C2CHS constructs. Col I was detected in these constructs, but at lower levels in constructs of biomaterials composed of CHS (C1C2CHS).

In summary, C1C2HS showed the highest histological staining values for PCNA (proliferation), SO and Col II, indicating that this biomaterial allows better proliferation and attainment of improved chondrogenic-ECM properties. Furthermore, C1C2HS showed the highest values for Col I, indicating the presence of MSCs, and a negligible amount of VK, indicating absence of mineralization. C1C2CHS had a higher intensity value for AB than C1C2HS, but was lower in SO and PCNA. It also had lower staining intensity than C1C2HS for VK, but higher for MMP-13, indicating the onset of hypertrophy. In general, C1C2CHS showed intermediate values, indicating a desirable early state of chondrogenic differentiation. C1C2 had a lower percentage of cells than C1C2HS and C1C2CHS and also showed less proliferation (PCNA) than C1C2HS but more than C1C2CHS. Otherwise, C1C2 presented intermediate values for chondrogenesis, differentiation and hypertrophy (Col X). C1-OLH3 also had lower values for proliferation (PCNA) and chondrogenesis (AB, SO, Col II), and did not have differentiation or hypertrophic characteristics. In C1CHS, the percentage of cells was so low that the values were not quantifiable.

In conclusion, our results show that biomaterials composed of both Col I and II allow growth and proliferation of hBMSCs throughout the scaffold. hBMSCs cultured in chondrogenic medium with TGF $\beta$ -3 in these biomaterials were able to initiate chondrocyte-like differentiation at an early state and to synthesize a cartilage-like ECM. Of all constructs tested in this study, C1C2HS and C1C2CHS presented better cartilage-like phenotype than the other ones, because of the expression of chondrogenic genes, deposition of GAGs and Col II in the ECM, and the lack of hypertrophy. Further studies are needed to shed light on the suitability of these biomaterials for tissue engineering. In an *in vitro* model of cartilage repair we will attempt to ascertain whether these constructs are capable of integration with surrounding host tissue and the optimal level of construct maturity for implantation. *In vivo* animal models are also needed to test the biochemical and biomechanical characteristics of the neo-cartilage.

**Acknowledgements.** We want to thank Bruna Parma from Opocrin, S.P.A. for supplying all the biomaterials; Julia Buján Varela and Natalio García Honduvilla from the Department of Medical Specialities, University of Alcalá de Henares; Ada Castro-Couceiro, Ph.D. and Catalina Sueiro-López, Ph.D. from research support services of the University of A Coruña (SAI-UDC); and laboratory technicians: María José Sánchez-Dopico, Purificación Filgueira Fernández and Noa Gollanes-Rey from INIBIC-CHUAC for their support and assistance. This study was supported by grants: Servizo Galego de Saúde; Cátedra Bioiberica from University of A Coruña; Instituto de Salud Carlos III CIBER BBN CB06-01-0040 and REDICENT (Rede de Investigación en Células Nai e Terapia Celular); Clara Sanjurjo-Rodríguez was beneficiary of a fellowship from Diputación de A Coruña, Spain.

## References

- Cavallo C., Desando G., Columbaro M., Ferrari A., Zini N., Facchini A. and Grigolo B. (2012). Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hyaluronan scaffold: Rationale for its use in the treatment of cartilage lesions. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 1559-1570.
- Chan B.P. and Leong K.W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *Eur. Spine J.* 17, S467-S479.
- Chen C.T., Burton-Wurster N., Borden C., Hueffer K., Bloom S.E. and Lust G. (2001). Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 19, 703-711.
- Chen C.W., Tsai Y.H., Deng W.P., Shih S.N., Fang C.L., Burch J.G., Chen W.H. and Lai W.F. (2005). Type i and ii collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *J. Orthop. Res.* 23, 446-453.
- Chen W.C., Yao C.L., Wei Y.H. and Chu I.M. (2011). Evaluating osteochondral defect repair potential of autologous rabbit bone marrow cells on type ii collagen scaffold. *Cytotechnology*. 63, 13-23.
- Chen S., Fu P., Cong R., Wu H. and Pei M. (2015). Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes Dis.* 2, 76-95.
- Cheng N.C., Estes B.T., Young T.H. and Guilak F. (2011). Engineered cartilage using primary chondrocytes cultured in a porous cartilage-derived matrix. *Regen. Med.* 6, 81-93.
- Cicione C., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T., Fuentes-Boquete I., Diaz-Prado S. and Blanco F.J. (2013). Effects of severe hypoxia on bone marrow mesenchymal stem cells differentiation potential. *Stem Cells Int.* 2013, 1-11.
- Cicione C., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T., Fuentes-Boquete I., Diaz-Prado S. and Blanco F.J. (2015). Alternative protocols to induce chondrogenic differentiation: Transforming growth factor-beta superfamily. *Cell Tissue Bank.* 16, 195-207.
- Claus S., Mayer N., Aubert-Foucher E., Chajra H., Perrier-Groult E., Lafont J., Piperno M., Damour O. and Mallein-Gerin F. (2012). Cartilage-characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Eng. Part C Methods*. 18, 104-112.
- De Franceschi L., Grigolo B., Roseti L., Facchini A., Fini M., Giavaresi G., Tschon M. and Giardino R. (2005). Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 75, 612-622.
- Díaz-Prado S., Muinos-Lopez E., Hermida-Gomez T., Esther Rendal-Vazquez M., Fuentes-Boquete I., de Toro F.J. and Blanco F.J. (2010). Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J. Cell. Biochem.* 111, 846-857.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J. and Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Ehlers E.M., Fuss M., Rohwedel J., Russlies M., Kuhnel W. and Behrens P. (1999). Development of a biocomposite to fill out articular cartilage lesions. Light, scanning and transmission electron microscopy of sheep chondrocytes cultured on a collagen i/iii sponge. *Ann. Anat.* 181, 513-518.
- Fuentes-Boquete I.M., Del Carmen Arufe Gonda M., Diaz Prado S.M., Hermida Gomez T., de Toro Santos F.J. and Blanco Garcia F.J. (2007). Tratamiento de lesiones del cartilago articular con terapia celular [treatment of joint cartilage lesions with cell therapy]. *Reumatol. Clin.* 3, S63-69.
- Fuentes-Boquete I.M., Arufe Gonda M.C., Diaz Prado S.M., Hermida Gómez T., de Toro Santos F.J. and Blanco F.J. (2008). Cell and tissue transplant strategies for joint lesions. *Open Transplant. J.* 2, 21-28.
- Fuss M., Ehlers E.M., Russlies M., Rohwedel J. and Behrens P. (2000). Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type i/iii collagen sponge under different culture conditions - a light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann. Anat.* 182, 303-310.
- Grigolo B., Roseti L., Neri S., Gobbi P., Jensen P., Major E.O. and Facchini A. (2002a). Human articular chondrocytes immortalized by hpv-16 e6 and e7 genes: Maintenance of differentiated phenotype under defined culture conditions. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 879-889.
- Grigolo B., Lisignoli G., Piacentini A., Fiorini M., Gobbi P., Mazzotti G., Duca M., Pavesio A. and Facchini A. (2002b). Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (hyaff (r) 11): Molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 23, 1187-1195.
- Han L., Grodzinsky A.J. and Ortiz C. (2011). Nanomechanics of the cartilage extracellular matrix. *Annu. Rev. Mater. Res.* 41, 133-168.
- He X., Wang Y. and Wu G. (2012). Layer-by-layer assembly of type i collagen and chondroitin sulfate on aminolyzed pu for potential cartilage tissue engineering application. *Appl. Surf. Sci.* 258, 9918-9925.
- Hellingman C.A., Davidson E.N., Koevoet W., Vitters E.L., van den Berg W.B., van Osch G.J. and van der Kraan P.M. (2011). Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived-mesenchymal stem cells: inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng. Part A* 17, 1157-1167.
- Hermida-Gomez T., Fuentes-Boquete I., Gimeno-Longas M.J., Muinos-Lopez E., Diaz-Prado S., de Toro F.J. and Blanco F.J. (2011). Bone marrow cells immunomagnetically selected for cd271+antigen promote *in vitro* the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng. Part A* 17, 1169-1179.
- Hollander A.P., Dickinson S.C. and Kafienah W. (2010). Stem cells and cartilage development: Complexities of a simple tissue. *Stem Cells*. 28, 1992-1996.

- Hu J., Feng K., Liu X. and Ma P.X. (2009). Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials* 30, 5061-5067.
- Hunziker E.B. (2002). Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432-463.
- Jin C.Z., Park S.R., Choi B.H., Park K. and Min B.H. (2007). *In vivo* cartilage tissue engineering using a cell-derived extracellular matrix scaffold. *Artif. Organs* 31, 183-192.
- Kagita E., Ikeda M., Wakitani S. and Takagi M. (2010). Effect of monosaccharides composing glycosaminoglycans on type 2 collagen accumulation in a three-dimensional culture of chondrocytes. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 51-54.
- Khoshgoftar M., van Donkelaar C.C. and Ito K. (2011). Mechanical stimulation to stimulate formation of a physiological collagen architecture in tissue-engineered cartilage: A numerical study. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 14, 135-144.
- Ko C.S., Huang J.P., Huang C.W. and Chu I.M. (2009). Type ii collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 177-182.
- Kock L., van Donkelaar C.C. and Ito K. (2012). Tissue engineering of functional articular cartilage: The current status. *Cell Tissue Res.* 347, 613-627.
- Lee J.M. and Im G.I. (2012). Pthrp isoforms have differing effect on chondrogenic differentiation and hypertrophy of mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 819-824.
- Lee C.T., Huang C.P. and Lee Y.D. (2006). Biomimetic porous scaffolds made from poly(l-lactide)-g-chondroitin sulfate blend with poly(l-lactide) for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules* 7, 2200-2209.
- Lee C.H., Cook J.L., Mendelson A., Moiola E.K., Yao H. and Mao J.J. (2010a). Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: A proof of concept study. *Lancet.* 376, 440-448.
- Lee H.Y., Kopesky P.W., Plaas A., Sandy J., Kisiday J., Frisbie D., Grodzinsky A.J. and Ortiz C. (2010b). Adult bone marrow stromal cell-based tissue-engineered aggrecan exhibits ultrastructure and nanomechanical properties superior to native cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 18, 1477-1486.
- Lisignoli G., Cristino S., Piacentini A., Toneguzzi S., Grassi F., Cavallo C., Zini N., Solimando L., Maraldi N.M. and Facchini A. (2005). Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomaterials* 26, 5679-5686.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods* 25, 402-408.
- Lopez-Ruiz E., Peran M., Cobo-Molinos J., Jimenez G., Picon M., Bustamante M., Arrebola F., Hernandez-Lamas M.C., Delgado-Martinez A.D., Montanez E. and Marchal J.A. (2013). Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 246-258.
- Maher S.A., Mauck R.L., Rackwitz L. and Tuan R.S. (2010). A nanofibrous cell-seeded hydrogel promotes integration in a cartilage gap model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 4, 25-29.
- Markway B.D., Tan G.K., Brooke G., Hudson J.E., Cooper-White J.J. and Doran M.R. (2010). Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant.* 19, 29-42.
- Matsumoto T., Cooper G.M., Gharaibeh B., Meszaros L.B., Li G., Usas A., Fu F.H. and Huard J. (2009). Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble fit-1. *Arthritis Rheum.* 60, 1390-1405.
- Melrose J., Isaacs M.D., Smith S.M., Hughes C.E., Little C.B., Caterson B. and Hayes A.J. (2012). Chondroitin sulphate and heparan sulphate sulphation motifs and their proteoglycans are involved in articular cartilage formation during human foetal knee joint development. *Histochem. Cell Biol.* 138, 461-475.
- Mouw J.K., Case N.D., Guldberg R.E., Plaas A.H.K. and Levenston M.E. (2005). Variations in matrix composition and gag fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 828-836.
- Narcisi R., Cleary M.A., Brama P.A.J., Hoogduijn M.J., Tuysuz N., ten Berge D. and van Osch G.J.V.M. (2015). Long-term expansion, enhanced chondrogenic potential, and suppression of endochondral ossification of adult human mscs via wnt signaling modulation. *Stem Cell Rep.* 4, 459-472.
- Negri S., Fila C., Farinato S., Bellomi A. and Pagliaro P.P. (2007). Tissue engineering: Chondrocyte culture on type 1 collagen support. *Cytohistological and immunohistochemical study. J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 57-63.
- Newman A.P. (1998). Articular cartilage repair. *Am. J. Sports Med.* 26, 309-324.
- Ohishi M. and Schipani E. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* 109, 277-282.
- Pabbruwe M.B., Esfandiari E., Kafienah W., Tarlton J.F. and Hollander A.P. (2009). Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials* 30, 4277-4286.
- Poole C.A., Flint M.H. and Beaumont B.W. (1987). Chondrons in cartilage- ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J. Orthop. Res.* 5, 509-522.
- Ragety G.R., Griffon D.J., Lee H.-B., Fredericks L.P., Gordon-Evans W. and Chung Y.S. (2010). Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomater.* 6, 1430-1436.
- Sanjurjo-Rodríguez C., Martínez-Sánchez A.H., Hermida-Gómez T., Fuentes-Boquete I., Blanco F.J. and Díaz-Prado S. (2014). Human cartilage tissue engineering using type i collagen/heparan sulfate scaffolds. *J. Regen. Med.* 3, 1-12.
- Schagemann J.C., Paul S., Casper M.E., Rohwedel J., Kramer J., Kaps C., Mittelstaedt H., Fehr M. and Reinholz G.G. (2013). Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells via biomimetic and bioactive poly-epsilon-caprolactone scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101, 1620-1628.
- Scotti C., Mangiavini L., Boschetti F., Vitari F., Domeneghini C., Fraschini G. and Peretti G.M. (2010). Effect of *in vitro* culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 18, 1400-1406.
- Steinert A.F., Ghivizzani S.C., Rethwilm A., Tuan R.S., Evans C.H. and Noeth U. (2007). Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* 9, 213-228.
- Tew S.R., Murdoch A.D., Rauchenberg R.P. and Hardingham T.E. (2008). Cellular methods in cartilage research: Primary human chondrocytes in culture and chondrogenesis in human bone marrow stem cells. *Methods* 45, 2-9.



# MSCs and collagen for cartilage repair

- Tritz-Schiavi J., Charif N., Henrionnet C., de Isla N., Bensoussan D., Magdalou J., Benkirane-Jessel N., Stoltz J.F. and Huselstein C. (2010). Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* 20, 167-174.
- Tuli R., Li W.J. and Tuan R.S. (2003). Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 5, 235-238.
- Varghese S., Hwang N.S., Canver A.C., Theprungsirikul P., Lin D.W. and Elisseeff J. (2008). Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol.* 27, 12-21.
- Wakitani S., Imoto K., Yamamoto T., Saito M., Murata N. and Yoneda M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 199-206.
- Wang C., Meng G., Zhang L., Xiong Z. and Liu J. (2012). Physical properties and biocompatibility of a core-sheath structure composite scaffold for bone tissue engineering *in vitro*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1-9.
- Wong C.-C., Chiu L.-H., Lai W.-F.T., Tsai T.-T., Fang C.-L., Chen S.-C. and Tsai Y.-H. (2010). Phenotypic re-expression of near quiescent chondrocytes: The effects of type ii collagen and growth factors. *J. Biomater. Appl.* 25, 75-95.
- Xu C., Lu W., Bian S., Liang J., Fan Y. and Zhang X. (2012). Porous collagen scaffold reinforced with surfaced activated plla nanoparticles. *Scientific World J.* 2012, 1-10.
- Zhang L., Yuan T., Guo L. and Zhang X. (2012). An *in vitro* study of collagen hydrogel to induce the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100A, 2717-2725.

Accepted March 11, 2016



# PLOS ONE

## Ovine mesenchymal stromal cells: Morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Ovine mesenchymal stromal cells: Morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering
<b>Short Title:</b>	Osteochondral tissue engineering
<b>Corresponding Author:</b>	SILVIA MARIA DIAZ-PRADO, PhD UNIVERSIDADE DA CORUÑA A CORUNA, SPAIN
<b>Keywords:</b>	CELL THERAPY OSTEOCHONDRAL TISSUE ENGINEERING SCAFFOLD CARTILAGE BONE MESENCHYMAL STROMAL CELL OVINE BETA-TRICALCIUM PHOSPHATE COLLAGEN
<b>Abstract:</b>	<p><b>Introduction:</b> Knowledge of ovine mesenchymal stromal cells (oMSCs) is currently expanding. Tissue engineering combining scaffolding with oMSCs provides promising therapies for the treatment of osteochondral diseases.</p> <p><b>Purpose:</b> The aim was to isolate and characterize oMSCs from bone marrow aspirates (oBMSCs) and to assess their usefulness for osteochondral repair using <math>\beta</math>-tricalcium phosphate (bTCP) and type I collagen (Col I) scaffolds.</p> <p><b>Methods:</b> Cells isolated from ovine bone marrow were characterized morphologically, phenotypically, and functionally. oBMSCs were seeded on bTCP and Col I scaffolds and the resulting constructs were evaluated by histology, immunohistochemistry and electron microscopy studies. Furthermore, oBMSCs were cultured on Col I scaffolds to develop an in vitro cartilage repair model that was assessed using a modified International Cartilage Research Society (ICRS) II scale.</p> <p><b>Results:</b> oBMSCs presented morphology, surface marker pattern and multipotent capacities similar to those of human BMSCs. oBMSCs seeded on Col I gave rise to osteogenic neotissue. Assessment by the modified ICRS II scale revealed that fibrocartilage/hyaline cartilage was obtained in the in vitro repair model.</p> <p><b>Conclusions:</b> The isolated ovine cells were demonstrated to be oBMSCs. oBMSCs cultured on Col I sponges successfully synthesized osteochondral tissue. The data suggest that oBMSCs have potential for use in preclinical models prior to human clinical studies.</p>
<b>Order of Authors:</b>	CLARA SANJURJO-RODRIGUEZ ROCIO CASTRO-VIÑUELAS TAMARA HERMIDA-GOMEZ TANIA FERNANDEZ-VAZQUEZ ISAAC MANUEL FUENTES-BOQUETE FRANCISCO JAVIER DE TORO-SANTOS SILVIA MARIA DIAZ-PRADO, PhD FRANCISCO JAVIER BLANCO-GARCÍA
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	

Question	Response
<p><b>Financial Disclosure</b></p> <p>Please describe all sources of funding that have supported your work. <b>This information is required for submission and will be published with your article, should it be accepted.</b> A complete funding statement should do the following:</p> <p>Include <b>grant numbers and the URLs</b> of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding.</p> <p><b>Describe the role</b> of any sponsors or funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If the funders had <b>no role</b> in any of the above, include this sentence at the end of your statement: <i>"The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."</i></p> <p>However, if the study was <b>unfunded</b>, please provide a statement that clearly indicates this, for example: <i>"The author(s) received no specific funding for this work."</i></p> <p>* typeset</p>	<p>This study was supported by grants: Instituto Coruñés de Implantología y Rehabilitación Oral, Servizo Galego de Saúde; Universidade da Coruña; Cátedra Bioiberica from Universidade da Coruña; Comunidad Autónoma de Madrid (S2009/MAT-1472); Centro de Investigación Biomédica en Red-Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina from Instituto de Salud Carlos III; Rede de Investigación en Células Nai e Terapia Celular e Grupos con Potencial de Crecemento from Xunta de Galicia (R2014/050 and GPC2014/048); Fundación Española de Reumatología (2014 grant); RCV was beneficiary of a grant from Diputación de A Coruña (Spain).</p>
<p><b>Competing Interests</b></p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.</p> <p>Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the <a href="#">PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests</a>)?</p> <p><b>If yes</b>, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: <i>I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:</i></p>	<p>"The authors have declared that no competing interests exist."</p>



<p>If no authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: <i>"The authors have declared that no competing interests exist."</i></p> <p>* typeset</p>	
<p><b>Ethics Statement</b></p> <p>You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or vertebrate animals, embryos or tissues. All information entered here should <b>also be included in the Methods section</b> of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.</p> <p><b>Human Subject Research (involved human participants and/or tissue)</b></p> <p>All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the <a href="#">Declaration of Helsinki</a>. Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.</p> <p>Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.</p> <p><b>Animal Research (involved vertebrate animals, embryos or tissues)</b></p> <p>All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare</p>	<p>Animal was performed in accordance with the guidelines of the Experimental Surgery Unit of the Training Technology Centre from Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Spain.</p> <p>This study was approved in accordance with the Ethics Committee for Animal Experimentation of the CHUAC.</p>

<p>and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "<a href="#">The use of non-human primates in research</a>." The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.</p> <p>If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.</p> <p>Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.</p> <p><b>Field Permit</b></p> <p>Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.</p>	
<p><b>Data Availability</b></p> <p>PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the <a href="#">PLOS Data Policy</a> and <a href="#">FAQ</a> for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.</p> <p>Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. <b>Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.</b></p> <p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>

Please describe where your data may be found, writing in full sentences. **Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is accepted.** If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of **XXX** with the appropriate details.

"All relevant data are within the paper and its Supporting Information files."

If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, “All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.”

If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, "All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX)." If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below. If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:

“Data are available from the **XXX**  
Institutional Data Access / Ethics  
Committee for researchers who meet the  
criteria for access to confidential data.”

“Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX.”

\* typeset

Additional data availability information:

Plos One journal  
Editor

A Coruña, 2<sup>nd</sup> May 2016.

Dear Editor:

It is a great pleasure for me to submit you the present manuscript entitled **“Ovine mesenchymal stromal cells: Morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering”** for its evaluation. I hope that this article could be considered for its publication in the Plos One Journal.

I would like to thank you for your time and I look forward the evaluation.

Yours sincerely,

Silvia María Díaz Prado, PhD.  
Medicine Department. University of A Coruña.  
Rheumatology Division. CIBER-BBN/ISCIII.  
Tissue Engineering and Cellular Therapy Group (GBTTC-CHUAC)  
A Coruña, Spain.

# Ovine mesenchymal stromal cells: Morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering

Clara Sanjurjo-Rodríguez<sup>1</sup>, Rocío Castro-Viñuelas<sup>2</sup>, Tamara Hermida-Gómez<sup>2</sup>, Tania Fernández-Vázquez<sup>2</sup>, Isaac Fuentes-Boquete<sup>1</sup>, Javier de Toro Santos<sup>1</sup>, Silvia Díaz-Prado<sup>1\*</sup>, Francisco J Blanco<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup> Cell Therapy and Regenerative Medicine Unit, Rheumatology Group, Institute of Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), University Hospital Complex A Coruña (CHUAC), Galician Health Service (SERGAS), Department of Medicine, Faculty of Health Sciences, University of A Coruña, A Coruña, Spain.

<sup>2</sup> Tissue Bioengineering and Cell Therapy Unit (GBTTC-CHUAC), Rheumatology Group, Institute of Biomedical Research of A Coruña (INIBIC), University Hospital Complex A Coruña (CHUAC), Galician Health Service (SERGAS), A Coruña, Spain.

\*Corresponding authors:

E-mail: s.diaz1@udc.es (SDP)

E-mail: fblagar@sergas.es (FJB)

# Abstract

Introduction: Knowledge of ovine mesenchymal stromal cells (oMSCs) is currently expanding. Tissue engineering combining scaffolding with oMSCs provides promising therapies for the treatment of osteochondral diseases.

Purpose: The aim was to isolate and characterize oMSCs from bone marrow aspirates (oBMSCs) and to assess their usefulness for osteochondral repair using  $\beta$ -tricalcium phosphate (bTCP) and type I collagen (Col I) scaffolds.

Methods: Cells isolated from ovine bone marrow were characterized morphologically, phenotypically, and functionally. oBMSCs were seeded on bTCP and Col I scaffolds and the resulting constructs were evaluated by histology, immunohistochemistry and electron microscopy studies. Furthermore, oBMSCs were cultured on Col I scaffolds to develop an *in vitro* cartilage repair model that was assessed using a modified International Cartilage Research Society (ICRS) II scale.

Results: oBMSCs presented morphology, surface marker pattern and multipotent capacities similar to those of human BMSCs. oBMSCs seeded on Col I gave rise to osteogenic neotissue. Assessment by the modified ICRS II scale revealed that fibrocartilage/hyaline cartilage was obtained in the *in vitro* repair model.

Conclusions: The isolated ovine cells were demonstrated to be oBMSCs. oBMSCs cultured on Col I sponges successfully synthesized osteochondral tissue. The data suggest that oBMSCs have potential for use in preclinical models prior to human clinical studies.

## Introduction

Articular cartilage and its supporting bone are tightly coupled, forming a connected osteochondral unit (1). Orthopaedic surgeons have recently focused on the treatment of osteochondral lesions because most of these lesions do not heal spontaneously and can develop into osteoarthritis (1, 2). Several treatment approaches have been tested, including osteochondral autologous transplantation or microfracture (3, 4). However, none of the currently available approaches have achieved clinical acceptance for repair of the osteochondral unit (1, 5, 6). This lack of effective treatment motivates research into the tissue engineering of a biological implant to replace the diseased joint (7, 8). In tissue engineering, scaffolds are indispensable as carriers of cells at the injured site that stimulate neotissue formation (9). In addition, scaffolds provide a comfortable niche for cells, stimulating them to synthesize matrix and replace the function of the native tissue (10).

$\beta$ -tricalcium phosphate (bTCP) is an absorbable ceramic that has been widely used for bone reconstruction due to its bioactive and osteoconductive properties (11-13). On the other hand, type I collagen (Col I) is inherently biocompatible and biodegradable and promotes cellular adhesion and proliferation (14). For these properties Col I has been extensively tested for both bone and cartilage repair (2, 15).

In most studies, scaffolds have been used in combination with cells from different sources. Mesenchymal stromal cells (MSCs) have become attractive for cartilage and bone tissue engineering (15) because of their easy isolation, expansion, self-renewal ability and multipotential differentiation properties (16,

17). Therapies based on MSCs or MSC-derived products to treat human diseases have yet to be tested in large animal models before starting clinical trials (18).

Preclinical studies in orthopaedic research using sheep as a large animal model are becoming common (2, 18-24). This is due to the marked similarities of the sheep with human bone/cartilage regeneration processes, joint structure, and weight bearing; thus ovine large animal models have potential in translational research (24, 25).

Knowledge of ovine MSCs is recently increasing and the sheep genome sequence was recently completed (26), aiding in gaining understanding of these cells. However, characterization of ovine MSCs is not well established (19) and controversy exists among the results (27).

To date, most cartilage/bone engineering studies developed in both animal and human models have shown heterogeneous results (28) and the analyses have usually focused at the neotissue level, not at the cellular level.

In this work we performed an exhaustive ovine bone marrow MSC (oBMSCs) characterization using surface marker expression and multipotent differentiation. The osteogenesis of oBMSCs cultured on bTCP and Col I scaffolds was tested in depth by histological and ultrastructural analyses. Moreover, the chondrogenic repair capacity of oBMSCs cultured on Col I scaffolds was evaluated using an *in vitro* cartilage repair model.



## **Materials and Methods**

### **Ovine sample procurement**

Bone marrow samples used to obtain oBMSCs were isolated from iliac crest aspirates of domestic sheep (*Ovis aries*) (n=6).

Samples of femoral condyles were obtained from previously slaughtered sheep (n=7) in accordance with the guidelines of the Experimental Surgery Unit of the Training Technology Centre from Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Spain.

This study was approved in accordance with the Ethics Committee for Animal Experimentation of the CHUAC.

### **Isolation and culture of ovine bone marrow stromal cells**

Iliac crest bone marrow aspirates were collected into centrifuge tubes (*Costar Corning Incorporated, New York, USA*) and centrifuged after clotting with culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM; *Lonza, Madrid, Spain*) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; *Gibco- Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain*) and 1% penicillin/streptomycin (P/S; *Gibco*) (5%FBS/DMEM). The supernatants were discarded. Under sterile conditions, the marrow clots were divided with tweezers into several parts on adherent culture plates (*Costar Corning Incorporated*) and grown in culture medium 20%FBS/DMEM at 37° C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

After 48 hours, the plates were washed with sterile saline solution (*Fresenius Kabi, Barcelona, Spain*), eliminating non-adherent cells and clots, and culture medium was added. The culture medium was then replaced every 3 days.

When cell confluency reached 80%, subculturing was performed for cell expansion. Briefly, the culture medium was removed; the plates were washed with sterile saline and incubated at 37°C for 2-3 minutes (min) with 2X trypsin-EDTA (*Sigma Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain*). The trypsin was then inactivated with 5%FBS/DMEM, and the cell suspension was collected and centrifuged for 7 min at 300xg. The resulting cell pellet was resuspended in 20% FBS/DMEM and seeded into more plates. 1:3 split ratio was used for cell expansion. A 15-min preplating technique (29) was performed at the first cell passage to eliminate any remaining macrophages or fibroblasts from the culture.

At the 2<sup>nd</sup>-8<sup>th</sup> passages, cells were used for morphological, phenotypical and functional culture studies.

## **Phenotypic characterization using flow cytometry**

At passages 3, 4, and 8 after culture expansion, cells from 3 animals were trypsinized, washed and analyzed by flow cytometry. Briefly, oBMSCs were harvested by trypsinization, washed and centrifuged at 300xg for 8 min. The cells were counted prior to flow cytometry and a total of  $2 \times 10^5$  cells were transferred to fluorescence-activated cell sorting (FACS) polypropylene tubes (NUNC<sup>TM</sup>, *VWR International, Radnor, Pennsylvania*). The antibodies used for these experiments are listed in Table 1. Optimal amounts of monoclonal antibodies (mAbs) were determined and added to each tube for 40 min at 4°C in

darkness. The antibodies used are specific for markers associated with mesenchymal and hematopoietic lineages. When necessary, cells were incubated for 30 min at 4°C in darkness with a secondary antibody to allow binding to the primary antibody. A control tube for each of the chromogens used contained equivalent amounts of isotype standards. A minimum of  $1 \times 10^5$  cell events per assay was acquired using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, Madrid, Spain). Data were analyzed using Cell Quest software (BD Biosciences) and the results are expressed as mean of positive percentage  $\pm$  standard error.

**Table 1: Antibodies used for flow cytometry**

<b>ISOTYPES</b>			
<b>Antibody</b>	<b>Clone</b>	<b>Specificity</b>	<b>Source</b>
FITC Mouse IgG1Kappa Isotype Control	MOPC-21		BD Pharmingen™
PE Mouse IgG1 Kappa Isotype Control	MOPC-21		DB Pharmingen™
PECy5 Mouse IgG1 Isotype Control	1F8		Abcam
Rabbit anti-mouse Inmunoglobulins/FITC			DAKO
<b>LABELED PRIMARY ANTIBODIES</b>			
PE Mouse Anti-Human CD34 monoclonal	581	Hematopoietic progenitor cell antigen 1 (HPCA1)	BD Pharmingen™
Mouse Anti-Sheep CD44:FITC monoclonal	25.32	Homing cellular adhesion molecule (HCAM)	AbD Serotec
PE Anti-Human CD29-PE monoclonal	TS2/16	$\beta$ 1 Integrin	BioLegend
FITC Mouse Anti-Rat CD45 monoclonal	OX-33	Leukocyte common antigen (LCA)	BD Pharmingen™
Purified Mouse Anti-Human CD69 monoclonal	FN50	Very early activation antigen	BD Pharmingen™
PE Mouse Anti-Human CD73 monoclonal	AD2	Esto-5'-nucleotidase	BD Pharmingen™
PE-Cy™5 Mouse Anti-Human CD90 monoclonal	5E10	Thy-1 membrane glycoprotein	BD Pharmingen™
<b>NON-LABELED PRIMARY ANTIBODIES</b>			

Mouse Anti-Human CD105:FITC monoclonal	SN6	Endoglin, SH2	AbD Serotec
PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD106 monoclonal	51-10C9	Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)	BD Pharmingen™
PE Mouse Anti-Human CD166-PE monoclonal	3A6	Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	Immunostep
Mouse Anti-Human CD271 monoclonal	ME20.4	Anti-Nerve Growth Factor Receptor (NGFR p75)	Sigma
Anti-Human/Mouse SSEA-4 monoclonal	MC-813-70	Stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA-4)	R&D Systems
Mouse Anti-Human STRO-1	NS1-Ag4-1	Stromal antigen 1 (STRO-1)	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank</i>
<b>SECONDARY ANTIBODIES</b>			
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC			DAKO

Antibodies used for phenotypical characterization by flow cytometry.

FITC=Fluorescein isothiocyanate; PE= Phycoerythrin

## Multipotential characterization of ovine bone marrow stromal cells

At 2<sup>nd</sup>-5<sup>th</sup> passages, oBMSCs from 3 animals were differentiated towards the three mesenchymal lineages: adipocyte, osteoblast and chondrocyte. Differentiation experiments were carried out under normoxic conditions (i.e., a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C).

### Adipogenic and osteogenic differentiation

oBMSCs were detached using trypsin-EDTA, seeded at 5x10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> in a chamber slide (*BD Falcon™*, *BD Biosciences*) for histology and at 50x10<sup>3</sup> in a 6-well-plate (*Costar Corning Incorporated*) for molecular analyses. Adipogenesis was induced by culturing for 21 days in human MSC (hMSC) Commercial Adipogenic Differentiation Medium (*Lonza*), following the manufacturer's

instructions, with 1 mg/ml of Rosiglitazone (*Sigma Aldrich Quimica SA*) added.

Osteogenesis was induced by culture for 21 days in hMSC Commercial

Osteogenic Differentiation Medium (*Lonza*), following the manufacturer's

instructions.

These culture media were changed every 2-3 days. Both adipogenic and

osteogenic differentiations were compared to a control consisting of cells

cultured for the same period of time in 20% FBS/DMEM. Differentiations were

confirmed by staining techniques and gene expression quantification using Real

Time-PCR (qPCR).

## **Chondrogenic differentiation**

Chondrogenesis was assessed using the micropellet formation ( $2.5 \times 10^5$  cells)

technique (30). oBMSCs were detached using trypsin-EDTA and centrifuged at

300xg for 10 min. The resulting pellet was cultured in hMSC Commercial

Chondrogenic Differentiation Medium (*Lonza*) with 10 ng/ml of human

transforming growth factor (TGF $\beta$ -3) (*Prospec-Tany Technogene Ltd., Rehovot,*

*Israel*) for 21 days, following the manufacturer's instructions. The culture

medium was changed every 2-3 days. Chondrogenic differentiation was

compared with cell micropellets cultured for the same period of time with 20%

FBS/DMEM. After 21 days, two cell aggregates were OCT (*Tissue-Tek cryo-*

*OCT compound, Thermo Fisher Scientific*) embedded and frozen for histology

and three cell micropellets were frozen, without OCT, for molecular analyses.

The presence of hyaline cartilage-characteristic molecules, such as type II Col

(Col II) and proteoglycans (PG), was detected by histological,

immunohistochemical and qPCR techniques as described below.

## **Bone and cartilage engineering**

Two different types of scaffolds were used: horse tendon Col I sponges and bTCP synthetic ceramic. Col I sponges (6 mm diameter x 1 mm thick) were supplied by the Italian company, *Opocrin, SPA, Corlo di Formigine-Modena*. They were used to test both osteogenic differentiation and chondrogenic repair capacities.

1000-2000  $\mu\text{m}$  grain bTCP (*Macrobone, Euroteknika Iberia, Barcelona, Spain*) was provided by the Instituto Coruñés de Implantología y Rehabilitación Oral (ICIRO) and used to test osteogenic differentiation.

### **Osteogenic differentiation on Col I sponges**

oBMSCs from 2 animals at the 3<sup>rd</sup> passage were cultured on the surface of sponges (200,000 cells/cm<sup>2</sup>) (3 replicates) for 30 days under normoxic conditions (humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C). Osteogenic differentiation was induced by culturing the oBMSCs in hMSC Commercial Osteogenic Differentiation Medium, following the manufacturer's instructions. This culture medium was changed every 2-3 days. In addition, each type of scaffold, without cells, was cultured in the same medium and for the same period of time to serve as a negative control. After 30 days of culture, each scaffold sample was collected for histological and immunohistochemical assays and electron microscope studies, as described below.

## **Osteogenic differentiation on beta-tricalcium phosphate**

### **ceramic**

oBMSCs ( $2 \times 10^5$ ) from 2 animals were also cultured with 100 mg of grain 1000-2000  $\mu\text{m}$  bTCP ceramic (3 replicates) for 30 days under normoxic conditions. Osteogenic differentiation was induced by culturing the oBMSCs in hMSC Commercial Osteogenic Differentiation Medium. This culture medium was changed every 2-3 days. In addition, each type of scaffold, without cells, was cultured in the same medium and for the same period of time to serve as negative controls for electronic microscope studies. After 30 days of culture, each scaffold sample was collected for histological and immunohistochemical assays and electron microscope studies, as described below.

## **Cartilage lesion repair using Col I sponges**

Ovine cartilage was obtained from femoral condyles and excised with a 6 mm biopsy punch (*Kai Medical, Solingen, Germany*). Lesions (3 mm) were made with a dental driller (*Gebr. Brasseler GmbH & Co. KQ, Lemgo, Germany*) with a rotor (*EWL K9*).

oBMSCs ( $2 \times 10^5$ ) from 2 animals were seeded on Col I sponges for 30 min at 37°C, and the construct was then placed inside the lesion. Punches were cultured using hMSC Chondrogenic Differentiation Medium with 10 ng/ml of human TGF $\beta$ -3, with medium changes every 3-4 days. After 8 weeks, punches were fixed in formaldehyde, paraffin embedded and histological and immunohistochemical assays were performed.

## **Molecular analysis of cell differentiation**

Differentiation of oBMSCs towards the three mesenchymal lineages (adipocyte, osteoblast and chondrocyte) was analyzed using molecular biology techniques.

## **RNA extraction and cDNA synthesis**

Differentiated cells were lysed mechanically by vigorous pipetting. Isolation of total RNA from cell culture was accomplished using Trizol Reagent (*Invitrogen*<sup>TM</sup> - *Thermo Fisher Scientific*), following the manufacturer's protocol. RNA was assessed for quantity at 260 nm using a NanoDrop<sup>TM</sup> spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific*). The A260/A280 ratio was calculated using the Nanodrop 1000 3.7.1. program (*Thermo Fisher Scientific*) to assess quality and purity. Total RNA was processed by RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) or stored at -80°C until use.

The RT-PCR reaction was performed from total RNA following the manufacturer's instructions, using the SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) in a Thermocycler (*Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific*). Samples were stored at -20°C before the amplification of target cDNAs. Positive and negative controls were included in each experiment.

## **Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) analyses**

qRT-PCR analyses were performed, using the primers and conditions shown in Table 2, on a LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument (*Roche, Basel, Switzerland*) using LightCycler 480 SYBR Green I Master (*Roche*). The PCR reaction consisted of 10 µl of Master Mix 2x concentrate, 0.25 µM of each forward and reverse



primer, the cDNA template and PCR-grade water up to a final volume of 20 µl in the LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (*Roche*). The initial enzyme activation at 95°C for 10 min was followed by 50 cycles of target amplification consisting of three sequential steps: 95°C for 10 seconds (s), 60°C for 5 s and 72°C for 9s. After amplification, a melting curve analysis was performed in one cycle at 95°C for 10 s, 65°C for 1 min and 97°C for 9 s. Finally, a cooling program was performed at 40°C for 20 s.

**Table 2. Primers used for the relative expression level (REL) of typical genes for differentiation and undifferentiation.**

Gene name	Primer Sequences	Product size	Reference Sequence
GAPDH	5'-ATCCTGCCAACATCAAGTGG-3' 5'-CAGCCTTCTCCATGGTAGTGA-3'	84 nt	NM_001190390.1
VIM	5'-ACATCGAGATCGCCACCTAC-3' 5'-TTGGTTTCCCTCAGGTTTCAG-3'	100 nt	KC904793.1
SOX2	5'-CGAGGGAATGGACCTTGTATAG-3' 5'-CTGCAAAGCTCCTACCGTATC-3'	88 nt	X96997.1
LPL	5'-TGAAACTTGGCAAAGCTACAGA-3' 5'-GGCGTCTTTTGTAAGTTACCTCAT-3'	78 nt	DQ016298.1
FABP4	5'-GGATGTGGTCAACATTAATCAGA-3' 5'-TGTCATCTGGAGTGACTTCATCA-3'	95 nt	EU301804.1
OP	5'-GCAGTCCTCACTGTCACAAGA-3' 5'-TGCTGTGGAATTAGCAGTCG-3'	105 nt	AF152416.1
AGG	5'-TTTGGACTTTGGCAGAATACC-3' 5'-AATCCAGAAGGAAGACCACTTG-3'	78 nt	FJ200438.1
COL II	5'-GGGCGAGACTGTGATTGAGT-3' 5'-GACAGGCCCTATGTCCACAC-3'	118 nt	FJ378650.1
COL I	5'-CCTGGATGCCATTAAGGTCT-3' 5'-TCTTGTCCTTGCTCTTGCTG-3'	113 nt	AF129287.1

Product size in nucleotides (nt) and GenBank reference. Housekeeping gene: Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH). To evaluate grade of undifferentiation: Vimentin (VIM) and SRY (sex-determining region Y)-box 2 (SOX2). For adipogenesis: Lipoprotein Lipase (LPL) and Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4). For osteogenesis: secreted Phosphoprotein 1 (OP). For chondrogenesis:

Aggrecan (AGG) and type II Col alpha 1 (COL II). For fibroblasts: type I Col alpha 1 (COL I).

The primers were purchased from Roche. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the internal control housekeeping gene to normalize the amount of target cDNA. Primers for Aggrecan (AGG) and Col II alpha 1 (COL II) genes were used to evaluate chondrogenesis. Primers for Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) and Lipoprotein Lipase (LPL) genes were used to evaluate adipogenesis. To evaluate osteogenesis, secreted Phosphoprotein 1 (OP) primers were used. To rule out differentiation towards fibroblasts, COL I primers were used. SRY (Sex-determining region Y)-Box 2 (SOX 2) and Vimentin (VIM) were tested to determine the degree of pluripotency.

Data analysis was performed for triplicates using the LightCycler 480 Relative Quantification software (*Roche*) and the qBase+ software (*Biogazelle, Gent, Belgium*).

## **Cytological and histological analyses**

### **Assessment of adipogenic and osteogenic differentiation of oBMSCs**

Cells were fixed in 4% formaldehyde before staining. For adipogenesis evaluation, differentiation was confirmed by detection of cytoplasmic lipid droplets by Oil red O (OR-O) staining. For osteogenesis evaluation,

differentiation was analyzed by Alizarin red (AR) staining, to assess the presence of calcium deposits.

### **Assessment of chondrogenic differentiation of oBMSCs**

For chondrogenesis evaluation, cell aggregates were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. 4 µm-thick paraffin sections were deparaffinized in xylol, rehydrated in a graded series of ethanol, and stained with hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome (MT), PAS-Alcian blue (PAS-AB) and Safranin O (SO), for Col and PG. Moreover, immunostaining for Col I, Col II and aggrecan (Agg) (Table 3) was performed to detect specific components of hyaline articular cartilage. The peroxidase/DAB ChemMate™ DAKO EnVision™ detection kit (*Dako, Barcelona, Spain*) was used to determine antigen-antibody interactions. Negative staining controls were achieved by omitting the primary monoclonal antibody. Samples were visualized using an optical microscope *Olympus BX61 (Olympus, Pennsylvania, USA)* equipped with a digital camera *Olympus DP70 (Olympus)*.

**Table 3. Antibodies used for immunohistochemistry.**

<b>Antibody</b>	<b>Clone</b>	<b>Specificity</b>	<b>Source</b>
Anti-Collagen I monoclonal	COL-I	Type I Collagen	Abcam
Anti-Collagen II monoclonal	5B2.5	Type II Collagen	Abcam
Anti-Aggregan ARGxx monoclonal	BC-3	Aggrecan	Abcam

Antibodies used for the analysis of chondrogenic differentiation by immunohistochemistry.

## **Assessment of osteogenic constructs and chondrogenic lesion repair**

### Histological analysis

Osteogenic cell and cell-free scaffolds, and chondrogenic repair models were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin.

To evaluate osteogenic constructs, samples were decalcified and 4- $\mu$ m-thick paraffin sections of scaffolds were deparaffinized in xylol, rehydrated in a graded series of ethanol, and stained with HE, Von Kossa (VK) and AR.

Immunostaining for Col I and osteocalcin (OCN) was also performed.

For cartilage repair evaluation, 4- $\mu$ m-thick paraffin sections were deparaffinized and stained as described above. For assessment of the quality of ovine cartilage repair, the histology scoring system, ICRS II, which was designed for use in human cartilage repair evaluation, was used. Some modifications to this grading system were made for adaptation for the analysis of ovine cartilage repair. Our modified score system comprised 7 of the 14 ICRS II parameters (31).

### Quantitative analysis of cytological and histological staining

Quantitative analyses of the staining and immunostaining described above were measured using ImageJ 1.48v (*National Institutes of Health, Bethesda, USA*).

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error.

## Electron microscopy analysis

Samples for electron microscopy were processed in the *Servizo de Apoio á Investigación* at the University of A Coruña (SAI-UDC).

For scanning electron microscopy (SEM), scaffolds were first fixed in 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer. Before further fixation in osmium tetroxide, the scaffolds were dehydrated in a graded series of ethanol. Samples were critical-point dried by flooding with liquid CO<sub>2</sub> in a Bal-Tec CPD 030 (BAL-TEC, *Balzers*, Liechtenstein) and gold-sputtered with the coater Bal-Tec SCD 004 (BAL-TEC). Samples were observed using a scanning electron microscope, JSM 6400 (*JEOL*, Tokyo, Japan).

For transmission electron microscopy (TEM) scaffolds were first fixed in 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer and dehydrated in a graded series of acetone and then fixed in osmium tetroxide. Samples were embedded in Spurr (*Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA*) and 2 µm sections were stained with toluidine blue to confirm the presence of cells. Then, 60-nm-thick Spurr sections were made and observed using a transmission electron microscope, Jeol JEM 1010 (*JEOL*).

For Energy Dispersive X-ray analysis (EDX), 5-µm-thick Spurr sections were obtained and deposited on a slide for SEM. Samples were coated with a thin layer of pure graphite carbon using BAL-TEC CEA 035 equipment (*BAL-TEC*). Samples were subsequently analyzed using a scanning electron microscope (*JEOL JSM-6400, JEOL*) equipped with a chemical microanalysis system through energy dispersive x-ray *OXFORD INCA ENERGY 200* (*Oxford instruments, Abingdon, England*).

## Statistical analyses

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism (*GraphPad Software, Inc.*), using non-parametric tests (Mann-Whitney *U* test). *p*-values <0.05 are considered to be statistically significant. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error.

## Results

### Morphologic characterization of oBMSCs

oBMSCs were successfully isolated from sheep bone marrow by puncture of the iliac crest. This cell population showed the typical spindle-shaped fibroblast-like morphology characteristic of the MSC, with irregular cytoplasm and numerous cytoplasmic prolongations (Fig. 1A). The isolated oBMSCs also showed adherence to plastic in culture and were very similar to those from human sources (Fig. 1B)(32).

### Immunophenotypic characterization of oBMSCs

Immunophenotypic analysis was performed to assess the expression of mesenchymal and hematopoietic markers in isolated oBMSCs. This analysis was performed on cells after isolation at passage 3 through 8. The cell-surface antigen profile of oBMSCs was analyzed using antibodies directed against human (CD29, CD34, CD69, CD73, CD105, CD106, CD166, CD271, SSEA4 and STRO1) and rat (CD45) CD surface markers because of the restricted number of antibodies are available for sheep (only anti-sheep CD44 was used). The expression profile of oBMSCs is shown in Fig. 1C-E. Although oBMSCs

have cell surface antigens similar to hBMSCs, most antibodies reacting with hBMSCs did not show reactivity with oBMSCs, with three exceptions: CD29, which showed 87.58%±11.70% positivity; CD166, which showed 66.85%±8.79% positivity; and SSEA4, which showed 11.67%±11.31% positivity. Anti-sheep CD44 showed 81.08%±16.68% positivity. oBMSCs were shown to be negative for CD45 (positive in ovine blood, data not shown), indicating no contamination with cells of hematopoietic origin (Fig. 1C). Moreover, we found that the oBMSCs population retained their phenotypic characteristics for at least 8 culture passages.

**Fig. 1. Morphologic and phenotypic characterization of oBMSCs.** (A) Image of ovine bone marrow mesenchymal stromal cells (oBMSCs) at passage 5 isolated from iliac crest aspirates. (B) Image of human bone marrow mesenchymal stromal cells (hBMSCs) at passage 10 isolated from bone marrow aspirates, as previously described (32). Both images show the typical spindle-shaped fibroblast-like morphology characteristic of the MSC. Original magnification x100. (C and D) Phenotypic characterization by flow cytometry of a representative population of oBMSCs for markers characteristic of MSCs and hematopoietic cells that react with sheep (C) and with human (D) antibodies. The purple line signifies the specific antibody, while the orange or green line represents the isotype control. (E) Bar graph representing the percentage (mean ± standard error) of positivity of the markers analyzed; markers characteristic of MSCs (CD29, CD44, CD166), embryonic cells (SSEA-4), and hematopoietic cells (CD45).

## ***In vitro* differentiation potential of oBMSCs**

### **Adipogenic differentiation of oBMSCs**

Adipogenic differentiation was assessed by OR-O staining at 0 and 21 days of culture in adipogenic medium (Fig. 2A and B). Stimulated oBMSCs showed positive staining ( $10.99\% \pm 1.26\%$ ) with single adipocytic multivacuolar cells secreting lipid droplets. However, non-stimulated oBMSCs, maintained 21 days in control medium (20% FBS/DMEM), showed the absence or much weaker staining for lipids than stimulated oBMSCs ( $0.35\% \pm 0.07\%$ ). The percentage of cells with positive OR-O staining was approximately 10 times higher in stimulated than in non-stimulated oBMSCs ( $p=0.002$ ). At day 0 (baseline), the percentage of staining positivity was  $0.17\% \pm 0.04\%$ , significantly lower than that in 21-day-stimulated cells ( $p=0.002$ ). However, there were no differences between day 0 and non-stimulated 21-day cells ( $p=0.132$ ).

Adipogenic differentiation was also assessed by qRT-PCR. The expression levels of the adipogenic lineage-specific genes, LPL and FABP4, were studied. The expression levels of two undifferentiation-specific genes, VIM and SOX2 (Fig. 2C), were also assessed. oBMSCs stimulated for 21 days in adipogenic medium showed an increased relative expression level (REL) of the genes FABP4 ( $132900.00 \pm 35750.00$ ) and LPL ( $36870.00 \pm 10840.00$ ), compared with oBMSCs at day 0 of differentiation ( $1.00 \pm 0.17$ ; and  $1.00 \pm 0.27$ , respectively). Considering the expression of the undifferentiation genes in the stimulated oBMSCs at 21 days, the expression levels of VIM and SOX2 decreased ( $0.10 \pm 0.02$  and  $0.15 \pm 0.02$ , respectively) compared with oBMSCs at day 0 day of differentiation ( $1.00 \pm 0.21$  and  $1.00 \pm 0.13$ , respectively) (Fig. 2C). oBMSCs



cultured for 21 days in control medium (20% FBS/DMEM) showed a decrease in the expression of FABP4 ( $0.02 \pm 0.00$ ) and LPL ( $0.23 \pm 0.01$ ), compared with oBMSCs at day 0 of differentiation. At 21 days in the oBMSCs cultured in control medium, the expression levels of VIM and SOX2 were decreased ( $0.14 \pm 0.03$  and  $0.25 \pm 0.07$ , respectively) compared with oBMSCs at day 0 of differentiation (Fig. 2C).

**Fig. 2. Adipogenic differentiation of oBMSCs.** (A) Ovine bone marrow mesenchymal stromal cells (oBMSCs) at day 0 (left) of differentiation and cultured for 21 days in non-differentiation control medium (20% FBS/DMEM; middle) and adipogenic-differentiation medium (right). The presence of adipocytes was assessed by detection of lipid drops using Oil Red O (OR-O) stain. Magnification x200. (B) Bar graph represents the percentage of cells positive for OR-O stain expressed as the mean  $\pm$  standard error. (C). “t0 Control” represents the expression of specific genes in oBMSCs at day 0 of differentiation. “t21 Control” represents the expression of specific genes in oBMSCs cultured for 21 days in non-differentiation control medium (20% FBS/DMEM). “t21 Adipog” represents the expression of specific genes in oBMSCs after culture for 21 days in adipogenic differentiation medium. mRNA levels were measured by quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR), as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the relative expression level (REL). The results are normalized to values obtained for oBMSCs at day 0 of differentiation, considered to equal 1. \* indicates  $p < 0.05$ .

## Osteogenic differentiation of oBMSCs

The osteogenic differentiation potential of oBMSCs was examined by determining the presence of calcification using AR stain (Fig. 3A and B). 21-day-stimulated oBMSC populations showed extracellular calcium deposition ( $81.15\% \pm 4.67\%$  positive staining). Non-stimulated oBMSCs, maintained in control medium (20% FBS/DMEM) for 21 days, showed less positivity ( $p=0.004$ ) for AR staining ( $8.91\% \pm 5.68\%$ ). oBMSCs populations at day 0 of differentiation showed a lower percentage of positive staining ( $0.04\% \pm 0.01\%$ ) than 21-day-stimulated and non-stimulated cells ( $p<0.05$ ).

Osteogenic differentiation was also assessed by qRT-PCR. The expression level of the osteogenic lineage-specific gene OP was studied. In addition, the expression levels of undifferentiation-specific genes VIM and SOX2 (Fig. 3C) were analyzed. oBMSCs stimulated for 21 days in osteogenic medium showed an increased expression of OP ( $2.73 \pm 0.23$ ) compared with oBMSCs at day 0 of differentiation ( $1.00 \pm 0.10$ ). The expression levels of SOX2 and VIM were lower in the stimulated oBMSCs at 21 days ( $0.00 \pm 0.00$  and  $0.65 \pm 0.03$ , respectively) than oBMSCs at 0 day of differentiation ( $1.00 \pm 0.15$  and  $1.00 \pm 1.05$ , respectively) (Fig. 3C). oBMSCs cultured for 21 days in control medium also showed an increased expression of OP ( $2.23 \pm 0.35$ ) compared with oBMSCs at day 0 of differentiation ( $1.00 \pm 0.10$ ). At 21 days in 20% FBS/DMEM, the expression of the undifferentiation gene VIM was approximately the same ( $0.96 \pm 0.16$ ) as that of oBMSCs at day 0 of differentiation. As in adipogenesis, no expression of the SOX2 gene was detected in oBMSCs cultured during 21 days in control medium (Fig. 3C).

**Fig. 3. Osteogenic differentiation of oBMSCs.** (A) Ovine bone marrow mesenchymal stromal cells (oBMSCs) at day 0 of differentiation (left) and after culture for 21 days in non-differentiation control medium (20% FBS/DMEM, middle) and osteogenic-differentiation medium (right) (Magnification x100). The presence of osteoblasts was assessed by detection of calcium deposits using Alizarin Red (AR) stain (Magnification x200). (B) Bar graph represents the percentage of cells positive for AR stain expressed as the mean  $\pm$  standard error. (C) The osteogenic differentiation potential was confirmed by quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). The expressions of osteogenic- and undifferentiation-specific genes were analyzed. "t0 Control" represents the expression of specific genes in oBMSCs at day 0 of differentiation. "t21 Control" represents the expression of specific genes in oBMSCs cultured for 21 days in non-differentiation control medium (20% FBS/DMEM). "t21 Osteog" represents the expression of specific genes in oBMSCs after culture for 21 days in osteogenic-differentiation medium. mRNA levels were measured by qRT-PCR as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the relative expression level (REL). The results are normalized to values obtained for oBMSCs at day 0 of differentiation, considered to equal 1. \* indicates  $p < 0.05$ .

### **Chondrogenic differentiation of oBMSCs**

Indicating chondrogenic differentiation, HE staining revealed the rounded morphology of the micromass cultures. Stimulated micropellets showed higher cellularity in the core than that found in non-stimulated cultures. However, both

possessed extracellular matrix (ECM), although total Col (Fig. 4A, MT) and PG (Fig. 4A, PAS-AB and SO) were more abundant in stimulated cultures. Immunostaining for Col I and II was also more prominent in the stimulated micropellets (Fig. 4A, Col I and Col II). However, the Col II/Col I ratio was three-fold higher in stimulated than in non-stimulated micromass cultures (Fig. 4B).

Chondrogenic differentiation was also assessed by qRT-PCR. The expressions of the chondrogenic lineage-specific genes COL II and AGG were tested. To eliminate differentiation towards fibroblasts, COL I was tested as well. Furthermore, the expression levels of two undifferentiation-specific genes, VIM and SOX2 (Fig. 4C), were also analyzed. oBMSCs stimulated for 21 days in chondrogenic medium showed an increased expression of the genes AGG ( $9.88 \pm 0.75$ ), Col I ( $4.14 \pm 0.81$ ) and COL II ( $1428.00 \pm 293.20$ ), compared with oBMSCs at day 0 of differentiation ( $1.00 \pm 0.59$ ;  $1.00 \pm 0.05$  and  $1.00 \pm 0.16$ , respectively). At 21 days, the expression level of SOX2 was also slightly increased ( $1.86 \pm 0.17$ ), whereas the expression level of VIM was decreased ( $0.60 \pm 0.05$ ), compared with oBMSCs at day 0 of differentiation ( $1.00 \pm 0.05$  and  $1.00 \pm 0.04$ , respectively) (Fig. 4C). oBMSCs cultured for 21 days in control medium did not show expression of AGG or COL II. Furthermore, COL I expression did not change compared with oBMSCs at day 0 of differentiation. Measuring the expression of the undifferentiation genes in the oBMSCs cultured in control medium for 21 days, the expression of VIM was slightly increased ( $1.50 \pm 0.44$ ) compared with oBMSCs at 0 day of differentiation ( $1.00 \pm 0.04$ ). Additionally, SOX 2 expression was significantly increased ( $1789.00 \pm 124.00$ ) in oBMSCs cultured for 21 days in control medium (Fig. 4C).

**Fig. 4. Chondrogenic differentiation of oBMSCs.** (A) Ovine bone marrow mesenchymal stromal cells (oBMSCs) in micromass culture for 21 days in non-differentiation control medium ("t21 Control"; 20% FBS/DMEM) and chondrogenic-differentiation medium ("t21 Chondro") (Magnification x100 and x200, respectively). Micromasses were stained with hematoxylin-eosin (HE), Masson's trichrome (MT), PAS-Alcian blue (PAS-AB) and safranin O (SO). Immunodetection of type I and type II collagen (Col I and Col II) was assessed on micromasses. (B) Bar graph represents the ratio of percentage of immunostaining for Col II/Col I. (C) The chondrogenic differentiation potential was confirmed by quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). The expressions of chondrogenic- and undifferentiation-specific genes were analyzed. "t0 Control" represents the expression of specific genes in oBMSCs at 0 day of differentiation. "t21 Control" represents the expression of specific genes in oBMSCs cultured for 21 days in non-differentiation control medium. "t21 Chondro" represents the expression of specific genes in oBMSCs after culture for 21 days in chondrogenic-differentiation medium. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the relative expression level (REL). The results are normalized to values obtained for oBMSCs at day 0 of differentiation, considered to equal 1. \* indicates  $p < 0.05$ .

***In vitro* osteogenic differentiation of oBMSCs cultured on collagen sponges and  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramic**

**Histological and immunohistochemical analyses of the osteogenic constructs**

Osteogenic constructs showed low cellularity on both types of scaffolds, with scant ECM formation. However, Col I sponges had cells with a cubic morphology resembling osteoblasts (Fig. 5A and B). Staining for AR and VK was significantly higher on Col I sponges than on bTCP ceramics ( $42.99\% \pm 2.25\%$  and  $10.30\% \pm 0.24\%$ ;  $p$ -value=0.012, respectively for AR and  $6.97\% \pm 1.31\%$  and  $2.21\% \pm 0.93\%$ ;  $p$ -value=0.024, respectively for VK) (Fig. 5A and C). Immunostaining for Col I and OCN revealed significantly higher positivity for both proteins on Col I sponges than on bTCP scaffolds ( $11.85\% \pm 1.07\%$  and  $2.47\% \pm 0.61\%$ ;  $p$ -value=0.002, respectively, for Col I protein and  $12.22\% \pm 1.46\%$  and  $5.51\% \pm 0.51\%$ ;  $p$ -value=0.002, respectively, for OCN protein) (Fig. 5B and C).

**Fig. 5. Osteogenic differentiation of ovine bone marrow mesenchymal stromal cells (oBMSCs) cultured on Col I sponges and  $\beta$ -tricalcium phosphate (bTCP) ceramic.** (A) Histological evaluation of osteogenic constructs stained with hematoxylin-eosin (HE), Alizarin Red (AR) and Von Kossa (VK). Magnification x100. (B) Immunohistochemical analysis of the osteogenic constructs immunostained for type I collagen (Col I) and osteocalcin

(OCN). Magnification x100. (C) Bar graph represents the percentage of cells positive for AR, VK staining and OCN and Col I immunostaining, expressed as the mean  $\pm$  standard error. \* indicates  $p < 0.05$

### **Ultrastructural analysis of osteogenic constructs**

Constructs of Col I sponges, analyzed by TEM, showed cells (Fig. 6A in dark blue) surrounding the calcium phosphate precipitates (Fig. 6A in black and white). Cells exhibited differing morphologies; round- (Fig. 6E), oval- (Fig. 6B), star- (Fig. 6I) and elongated-shaped (Fig. 6D, H, J), and remained as aggregates (Fig. 6B, C, F, G). In these aggregates, cells, containing few small prolongations (black arrows), were observed to be in contact with each other. Increased numbers of vacuoles (red stars) existed at the contact areas between cell membranes. Many calcium phosphate precipitates were observed, not only in the cytoplasm of the cells (Fig. 6D, J), but also in the extracellular space (Fig. 6B, C, F, H, I). In the cytoplasm, and before being secreted outside the cell, these precipitates appeared inside vacuoles (Fig. 6D, J, I; red arrows). Occasionally, these vacuoles were empty, perhaps because the precipitate had already been secreted outside the cell (Fig. 6C, I, G; red arrowheads). In general, cells were organelle-rich. Granular endoplasmic reticula with ribosomes (Fig. 6D, I; white arrow), mitochondria with cristae (Fig. 6D, J, I, H; white stars) and euchromatic nuclei (Fig. 6C, E, G, I) were observed. In addition, in the cytoplasm of differentiated cells, the accumulation of multiple matrix vesicles was observed (Fig. 6C).

The ultrastructural analysis of bTCP ceramic showed cells (Fig. 6K in dark blue), with an elongated-shape (Fig. 6L, M, R, S) and small prolongations (Fig. 6 L, O, Q; black arrows) surrounding the calcium phosphate precipitates (Fig. 6A in black and white). These cells formed aggregates (Fig. 6M, R) and showed accumulations of roughly fused spherical material in the cytoplasm (Fig. 6M, N, P; black star). These accumulations were electron-dense because of their high osmium tetroxide affinity, indicating high lipid content. Furthermore, these accumulations were more abundant on bTCP ceramic than on Col I sponges. Calcium phosphate deposits were only observed outside the cell (Fig. 6L, N, P, S), although it was not possible to distinguish between deposits secreted by the differentiated cells and precipitates from the bTCP ceramic. In addition, in the cytoplasm of the cells, multiple empty vacuoles that could have initially contained such deposits were observed (Fig. 6N, T, Q; red arrows). In general, cells showed an organelle-rich composition (Fig. 6M, O, Q, R, S) with multiple vesicles (Fig. 6L, M, N, Q) and euchromatic nuclei (Fig. 6L, O, Q).

**Fig. 6. Transmission electron microscopy.** Images obtained from type I collagen (Col I) and  $\beta$ -tricalcium phosphate (bTCP) ceramic constructs. The different scaffolds are shown in rows. The first two rows (from A to J) are Col I sponges and the last two rows (from K to T) are bTCP constructs. A, K: semi-thin sections (1  $\mu$ m) of the constructs embedded in Spurr and stained with toluidine blue (Magnification x200). Scales of bars: F, 10  $\mu$ m; B, C, G, H, L, P, Q, 5  $\mu$ m; D, E, I, J, M, N, O, R, S, 2  $\mu$ m; T, 1  $\mu$ m. Black arrows: prolongations; red stars: vacuoles; red arrows: precipitates inside vacuoles; red arrowheads:



empty vacuoles; white arrows: rough endoplasmic reticulum; white stars: mitochondria; black stars: electron-dense spheres.

## **Energy dispersive X-ray study of Col I constructs**

To verify that the deposits found in the extracellular space and in the cytoplasm of the cells cultured on Col I sponges were composed of calcium phosphate, an energy dispersive X-ray (EDX) study was performed. The analysis was performed at different areas of the sample preparations to ascertain its exact composition. These areas included a region of the precipitate (Fig. 7A, highlighted with the number “1”) and a region of cells (Fig. 7A, highlighted with the number “2”). As can be seen in Fig. 7B, C and D, the main elements found in the precipitate were carbon ( $47.95\% \pm 4.93\%$ ) and oxygen ( $18.77\% \pm 2.86\%$ ) followed by calcium ( $11.87\% \pm 0.41\%$ ) and phosphate ( $6.51\% \pm 0.19\%$ ). These elements were, however, not detected in the region of cells (Fig. 7B, C, D); instead, carbon ( $69.725\% \pm 0.95\%$ ) and oxygen ( $9.08\% \pm 1.02\%$ ) followed by copper ( $10.11\% \pm 0.56\%$ ) and zinc ( $6.41\% \pm 0.11\%$ ) were found. The EDX analysis was not performed on the bTCP ceramic constructs because it was not possible to distinguish between the deposits secreted by the differentiated cells and the precipitates from the bTCP ceramic.

**Fig. 7. Energy dispersive X-ray (EDX) analysis performed on the type I collagen (Col I) constructs.** (A) Images obtained by scanning electron microscopy (SEM) showing the two areas analyzed; the number “1” indicates a precipitate, and the number “2” indicates a cell aggregate. (B) Spectrum of the two regions analyzed showing the elements detected: Spectrum 1

corresponding with a precipitate and spectrum 2 with a cell aggregate. (C) Bar graph represents the percentage of the elements found in five different analyzed spectra; three from the analyzed precipitate and the other two from the cell aggregate. (D) Map of C, Ca and P distribution analyzed in the whole sample.

## **Morphometric analysis of osteogenic constructs**

Cell-free Col I sponges (Fig. 8A-E) showed by SEM that their general structure were fibrous whereas bTCP (Fig. 8K-O) ceramics were smoother. Because of the lack of microporosity, cells grew on and adhered to the surface of bTCP, but not inside, whereas the Col I structure had allowed cell growth throughout the scaffold, as observed in different sections. On Col I constructs, cells showed different morphologies from flattened (Fig. 8F, G, H; black arrows) to rounded (Fig. 8I, J; black arrows), but only flattened cells were seen on bTCP (Fig. 8P-S; black arrows). Cells presented small prolongations on both scaffolds (Fig. 8G, H, P, R; red stars).

Furthermore, more volume of ECM was observed in Col I constructs (Fig. 8G-J; black stars), compared with bTCP constructs (Fig. 8Q, S, T; black stars).

**Fig. 8. Scanning electron microscopy (SEM).** SEM images obtained from type I collagen (Col I) and  $\beta$ -tricalcium phosphate (bTCP) ceramic constructs. Cell-free Col I sponges (W/O CELLS, A-E) and Col I constructs with cells (W/CELLS, F-J) are shown in the two first rows. Cell-free bTCP scaffolds (W/O

CELLS, K-O) and bTCP constructs with cells (W/ CELLS, P-T) are shown in the last two rows. Scales of bars: K, P 700  $\mu\text{m}$ ; L, Q 400  $\mu\text{m}$ ; A, F, M, R 200  $\mu\text{m}$ ; B, G, N, S 50  $\mu\text{m}$ ; C, H 40  $\mu\text{m}$ ; D, I 20  $\mu\text{m}$ ; E, J, O, T 10  $\mu\text{m}$ . Black arrows: cells; black stars: extracellular matrix; red stars: cell prolongations.

## **Chondrogenic differentiation of MSCs cultured on collagen sponges in an *in vitro* articular cartilage repair model**

Although our first goal in the articular cartilage repair model was to produce semicircular lesions on the cartilage surface, deeper lesions (from side to side) were generated in some of the replicas (Fig. 9A) because of the thinness of the ovine cartilage. Several replicas also had slivers of native cartilage inside the lesion (Fig. 9A; medium results, second row) because of drill movement during handling.

HE staining allowed the observation of neotissue formation inside the lesion (Fig. 9A, intermediate and best replicas). Col I scaffolds ranged from barely- (worst replica) to nearly totally- degraded (best replica) (Fig. 9A).

The first parameter analyzed in the adapted ICRS II scoring system, using MT staining, was “tissue morphology” (Fig. 9). This criterion was assessed by analyzing the collagen fiber distribution. The worst results did not show any ECM, scoring a value of 0%. Intermediate results showed heterogenic and obvious collagen fibers, being an intermediate tissue between fibrocartilage and fibrous tissue (25% score). In the best results, collagen fibers were more

evident in the deep zone of the repaired tissue than in the superficial zone (60% value) (Fig. 9A and B).

The second criteria used to evaluate PG content was “matrix staining” (Fig. 9), which was assessed using SO staining. The results ranged from 0% (the worst) to 35% (the best).

The next two variables, analyzed by HE staining, were “cell morphology” and “chondrocyte clustering.” In the worst results, 10% of the cells were rounded, while in the intermediate and best results, approximately 50-55% of the cells were rounded. All the replicas showed absence of clusters, scoring 100%.

The next item studied was “surface architecture.” The worst results showed disruptions on the surface (5%); while intermediate results revealed an upper surface smoother than the lower one (50%). The best replicas showed lack of disruptions, delaminations and loosening, scoring 80%. The final criterion analyzed, “integration with native cartilage,” ranged from 0% (worst results) to 75-90% (intermediate and best replicas, respectively). Finally, to score “overall assessment,” the statistical mean of the values for all 6 parameters analyzed was calculated. The worst cartilage repair score was 19%, indicating fibrous tissue; the intermediate cartilage repair scored 52%, indicating a fibrocartilage tissue; and finally, the best neotissue formed was graded in the midrange of fibrocartilage and hyaline cartilage (70%).

Some replicas have been immunostained for Col I, Col II and Agg. The collagen content of the repaired tissue was absent in the worst results, whereas in the intermediate and best replicas, both ECM proteins were present (Fig. 9A).

Aggrecan was also absent in the worst results, but slightly present in the other two results.

**Fig. 9. Chondrogenic differentiation of ovine bone marrow mesenchymal stromal cells (oBMSCs) on type I Col (Col I) sponges in an *in vitro* cartilage repair model.** (A) Images of the histological analyses performed in the best, intermediate and worst results, stained with hematoxylin-eosin (HE), Safranin O (SO), Masson's trichrome (MT) and immunostained for aggrecan (Agg), collagen type I and II (Col I and Col II). Magnification x40. (B) Table that represents the cartilage repair scoring according to the modified ICRS II scale (31) of each replica.

## Discussion

Previous studies have reported the isolation of oMSCs from bone marrow (5, 23-25), adipose tissue (33-35), umbilical cord blood (35, 36), peripheral blood (21, 37), amniotic fluid (38, 39), dermis (40) and periodontal ligament (41).

Despite the increasing use of sheep as a large animal model for tissue engineering, because of their similarities to humans in size, joint architecture and healing mechanisms (25), ovine MSCs have been poorly characterized compared to human MSCs (24). Accordingly, the aim of this study was to first perform an extensive morphologic, immunophenotypical and functional characterization of isolated oBMSCs. Second, the *in vitro* osteogenic differentiation of oBMSCs cultured on Col sponges and bTCP ceramic was

studied, and finally, the chondrogenic differentiation of oBMSCs cultured on Col sponges in an *in vitro* articular cartilage repair model was analyzed.

For our study, oBMSCs were obtained from iliac crest aspirates, the most common approach described in the literature, to collect bone marrow (2, 13, 15, 17, 23-25, 42). For oBMSCs isolation, the simplest and easiest protocol for successful isolation of hBMSCs was used, omitting two steps sometimes applied in other oBMSCs isolation protocols: density gradient centrifugation (2, 18, 19, 25, 33, 43-45) and erythrocyte lysis (15). Several reports simply assumed that cells isolated from bone marrow were oBMSCs, omitting any further extensive characterization process (2).

In our study, cells with adherence to culture plastic and a typical spindle-shaped fibroblast-like morphology were isolated. As Rentsch *et al.* (45), Al Fageh *et al.* (17) and McCarty *et al.* (25) described, we also observed that these cells presented prolongations and typical fibroblast-like morphology. oBMSCs have been reported to be smaller (45) and to show an *in vitro* higher proliferation rate and longer life span (28) than their human counterparts, although we did not test these parameters.

Following the International Society of Cell Therapy criteria (46), hMSCs have to express at least the CD73, CD90 and CD105 cell surface markers. There is little information about the cell surface antigen profile of isolated oBMSCs because of the limited availability of antibodies specific for sheep (25). This lack of information is also due to human antibodies not having cross-reactivity with sheep antigens. Therefore, when using human antibodies, the absence of expression of such cell surface markers needs to be interpreted with caution

(27). The antigen expression pattern of oBMSCs has been reported to be positive for human CD44 and CD105, and negative for ovine CD45 (5). Adamzyk *et al.* (19) observed that oBMSCs expressed human CD73, although only in some specimens, and Martínez-Lorenzo *et al.* (34) observed high positivity for human CD90, but very low positivity for human CD73 and CD105. In agreement with the results published in the literature, human antibodies for CD73 (18), CD90 (18, 25) and CD105 (18, 25, 43) did not react positively with our oBMSCs. This absence of expression may be due to the lack of cross reactivity of these antibodies between species. Consistent with the literature, we found absence of rat CD45 antigen (5, 25, 43), indicating that the cells were not of hematopoietic origin. Moreover, we observed uniformly high cross-reactivity for human CD29, ovine CD44 and human CD166, as described by others (13, 23, 25, 43). These markers have been associated with human bone marrow stromal, adipose and dental pulp cells (23). oBMSCs isolated by Zannettino *et al.* (28) also expressed ovine CD29 and mouse CD44. Furthermore, we found positivity for an embryonic stem cell marker, hSSEA4, but only in younger specimens. Therefore, taking these results together, the oBMSCs cell-surface antigen profile seems similar to the expression profile of hBMSCs, in that they express markers of mesenchymal and embryonic stem cells (32, 47).

In the literature, there are some studies that did not perform any functional characterization of oBMSCs (2, 15), isolating these cells only by culture-plastic adherence. Other studies assessed differentiation potential into only one cell lineage, including Martínez-Lorenzo *et al.* (34), who just tested chondrogenic differentiation, and Reichert *et al.* (23), who just tested osteogenic differentiation. Some studies have assessed the capacity of oBMSCs to

differentiate into the three lineages (16, 28, 43-45), while other studies have performed both histological and RT-PCR analysis of differentiation (5, 25). In other reports, published before the complete sequencing of the sheep genome (26), multiple sequence alignment of bovine, human, and rat, among other species, were used for RT-PCR primer design (2, 20, 25). Therefore we performed an exhaustive multipotent differentiation analysis in which qRT-PCR primers were synthesized, based only on the sheep genome, to quantify specific genes for each cell lineage. Uniquely in our study, assessments of the gene expression of undifferentiation markers, such as VIM and SOX2, were also assessed. These studies were performed at 0 and 21 days of differentiation, not only in stimulated differentiation media, but also in non-stimulated control DMEM medium.

To achieve adipogenesis, a human differentiation medium was initially used without success (data not shown), confirming results obtained by Mrugala *et al.* (5). Their report indicated that the stimulus needed to induce adipogenic differentiation differs for human and ovine cells. Thus, adipogenic differentiation did not occur when oBMSCs were cultured in the media typically used to induce hBMSC adipogenesis. Complementation of the differentiation media with dexamethasone and rosiglitazone was needed to trigger the ovine adipogenic differentiation process (5, 16, 48). In our experimental culture conditions, including dexamethasone and rosiglitazone, oBMSCs differentiated adipogenically, as shown by our observations of cytoplasmic lipid droplets, an increased expression of adipogenic genes (LPL and FABP4), and a decreased expression of undifferentiation (VIM and SOX2) genes. Our results are in accordance with previous reports (5, 21, 24, 25, 28, 43, 44). The effect of



adipogenic culture media on differentiation of oBMSCs was studied by Adamzyk *et al.* (19). These authors obtained oBMSC adipogenesis without donor variations, but with a larger variation due to media used. In contrast, they found that variation in osteogenic differentiation was influenced by donor, protocol and preculture-dependent variations. After 21 days of osteogenic stimulation, we histologically observed the presence of calcification and an increased expression of OP at the gene level. These results agree with previous reports (5, 16, 21, 23-25, 28, 43). Moreover, after 21 days in control culture media, we also observed slight AR staining and increased expression of the OP specific-lineage gene. In the absence of stimulation, high basal levels of OP were also obtained by Mrugala *et al.* (5), possibly due to growth factors that stimulate osteogenesis in the FBS included in their culture media (49). Surprisingly, in our stimulated samples, expression of the VIM undifferentiation gene was elevated, indicating the presence of mixed undifferentiated and differentiated cells.

We observed that oBMSCs were able to differentiate towards chondrocyte-like cells only when TGF $\beta$ 3 was added to the chondrogenic culture medium, as previously reported by Mrugala *et al.* (5). However, Martínez-Lorenzo *et al.* (34) did not obtain good chondrogenesis using TGF $\beta$ 3 exclusively, finding it necessary to add bone morphogenetic protein-6 (BMP-6). In our study, oBMSCs were highly positive for CD44, a putative marker of enhanced chondrogenic capacity (50). The ability of oBMSCs to trigger chondrogenesis was assessed using a pellet culture system, as previously reported (5, 15, 24). This three-dimensional culture enables stronger cell-to-cell contact (51) allowing increased presence of Col II throughout the matrix (16). Histologically, we found the presence of PG and Col in the ECM of pellet cultures.

Immunohistochemically, for the Col II:Col I ratio, a measure of chondrogenic differentiation (52), we obtained a one-fold increase of this ratio compared to the ratio previously reported for humans (53) and molecular analysis demonstrated further increases in COL II expression compared to COL I. The expression of AGG, one of the main PGs of ovine (20) and human (54) cartilage ECM was only evident in stimulated cells, indicating the success of oBMSC chondrogenesis.

Applications of MSCs, especially in combination with biomaterials, have raised optimism for future therapies to repair tissues including cartilage and bone (19). TCP resorbable ceramics are widely used as bone fillers in orthopaedic surgeries for treatment of long bone fractures (28). Gupta *et al.* (55) compared cell-enriched TCP grafts, TCP alone, and autografts in an *in vivo* model. They found that TCP alone could not serve as an effective graft in the absence of osteoprogenitor cells, while autologous bone marrow with TCP increased bone formation. El-Jawhari *et al.* (56) found that the addition of Col to natural bovine bone scaffolds improved the attachment, survival and proliferation of hBMSCs. Using histology and electron microscopy, we observed more cell attachment, ECM deposition and osteogenic phenotype in Col sponges than in bTCP ceramics. This might be attributed to the fact that our cells express high levels of CD29. Some subclasses of this marker are associated with more efficient binding to Col-based scaffolds (28). The use of Col I scaffolds possesses various beneficial properties for clinical application, including biodegradability, low immunoreactivity and enabling the transport of nutrients (15, 57); these properties have led to their wide use in tissue engineering (57).

Histologically, we found osteoblasts in Col constructs, as previously described in *in vivo* bone repair using MSCs with platelet-rich plasma (PRP)(33). We also confirmed the presence of osteoblasts in Col constructs by detecting OCN, a bone protein exclusively synthesized by these cells (58). Moreover, VK and AR staining confirmed the presence of bone cells by the specific presence of insoluble calcium phosphate salts (58) and calcium deposits (59) in the extracellular spaces.

The EDX analysis provides a useful tool for elemental quantification in tissues, allowing the semi-quantification of the amounts of Ca and P in bone (60). In our study, we performed an EDX analysis to confirm the presence of phosphate-calcic precipitates secreted by osteogenic differentiated cells in Col constructs. We obtained the same Ca/P ratio in these deposits as that described by Perdikouri *et al.* (60) in a rat fracture healing model. Melrose *et al.* (61) also reported that Ca and P were the major elements detected in calcic deposits formed in sheep intervertebral discs.

Scanning electron microscopy showed different cell morphologies on bTCP and Col biomaterials. Schmitt *et al.* (58) also found different morphologies depending on the surface topography of different types of scaffolds. Thus, in some biomaterials cells were capable of growth inside the scaffold while in others, cells were flattened and more dispersed on the surface. On bTCP, oBMSCs were also flattened but dispersed along the outer side of the biomaterial, whereas in Col biomaterial, cells could grow throughout the scaffold because of its higher porosity. Using TEM, we observed that osteogenic differentiated oBMSCs acquired an osteoblast-like phenotype on both biomaterials, as also described by Ozen *et al.* (62). Desantis *et al.* (63) found

two cell types in oBMSC pellets, electron-dense and electron-lucent, while we only observed one cell type. Our osteogenic differentiated cells were similar to their electron-lucent counterparts.

*In vitro* testing provides standardized and quantifiable information about cytotoxicity, cell proliferation and differentiation capacity rate more easily than *in vivo* testing. Moreover, it is accepted that *in vitro* testing is used as a first stage test to avoid the unnecessary use of animals in materials testing (64). However, it is impossible to create *in vitro* bone repair models because it is not possible to maintain long-term bone cultures.

Several authors (15, 20) have developed chondrogenic *in vitro* studies using ovine cells and different types of scaffolds. Endres *et al.* (20) cultured ovine chondrocytes on polyglycolic acid (PGA)-fibrin biomaterials. They found that chondrocytes were surrounded by ECM, rich in PG, and had the homogenous distribution of Col II characteristic of hyaline cartilage. Schulz *et al.* (15) tested the *in vitro* formation of cartilaginous grafts using Col I hydrogels and ovine cells. They compared the phenotype of constructs from ovine chondrocytes and oBMSCs and achieved better results using the latter. However, these previous studies did not test the constructs in a native cartilage environment as we did. We created an ovine cartilage repair model and evaluated the capacity of repair using oBMSCs and Col I constructs.

Using a modified ICRS II scale (31), our construct replicas obtained scores from 19% (fibrous tissue) to 70% (fibrocartilage/hyaline cartilage) out of 100% (hyaline cartilage). We should point out that this scale was designed to evaluate *in vivo* osteochondral human repair. On one hand, only histological parameters

were taken into account. On the other hand, in human cartilage the presence of chondrocyte clusters is associated with a pathological state, unlike ovine cartilage where it is usual to find more than one chondrocyte per lacuna (20, 31).

In our work, variability between replicas was observed. The small lesion size due to the thinness of ovine cartilage could contribute to this variability between replicas (2). Other limitations of this study may be the time of culture and the absence of mechanical stimuli.

We used shorter culture times (2 months) than those described in the literature (65). Mathematical models have predicted a timeframe *in vivo* of at least 18 months to obtain completely mature cartilage. This agrees with clinical studies that demonstrate that cartilage repair is a slow process (65). However, longer culture times considerably increase the risk of culture contamination and cartilage degradation (66). Likewise, the absence of mechanical stimuli may impact adversely on the quality of newly formed repair tissue. However, our model allows analyzing cartilage samples from the same donor using different study variables, and testing engineered constructs in the native cartilage environment.

In conclusion, the results from the present study demonstrated that oMSCs have been effectively isolated from bone marrow aspirates and showed morphological, phenotypical and functional properties similar to those observed in their human counterparts. Furthermore, Col I scaffolds can be used as temporary matrices for cell proliferation, migration, and osteochondral differentiation of oBMSCs. Additionally, in an *in vitro* cartilage repair model, we

demonstrated that oBMSCs cultured on Col I sponges can successfully form fibrocartilage/hyaline cartilage tissue. Finally, this study suggests that oBMSCs may have potential for use in tissue engineering to facilitate more predictable regeneration of cartilage/bone tissue using an ovine preclinical model as a large animal model prior to human clinical studies.

## Acknowledgements

We want to thank Bruna Parma from Opocrin, S.P.A. for supplying Col I scaffolds; V. Seoane-Mato and J.M. Cruz-Valiño from Instituto Coruñés de Implantología y Rehabilitación Oral (ICIRO) for kindly providing bTCP scaffolds; UCEX (Unit of Experimental Surgery) from CHUAC for providing ovine cartilage samples; Ada Castro-Couceiro, Ph.D. for electron microscopy research support services at the Universidade da Coruña (SAI-UDC); and laboratory staff: María José Sánchez-Dopico, Purificación Filgueira-Fernández, Noa Goyanes-Rey and Inés Seijo-Calviño from INIBIC-CHUAC for their support and assistance. This study was supported by grants: ICIRO, Servizo Galego de Saúde; Universidade da Coruña (UDC); Cátedra Bioiberica from UDC; CAM (S2009/MAT-1472); CIBER-BBN from Instituto de Salud Carlos III; Rede de Investigación en Células Nai e Terapia Celular (REDICENT), Xunta de Galicia (R2014/050); GPC, Xunta de Galicia (GPC2014/048); Fundación Española de Reumatología (2014 grant); R. Castro-Viñuelas was beneficiary of a grant from Diputación de A Coruña (Spain).

## References

1. Dhollander AAM, Guevara Sanchez VR, Almqvist KF, Verdonk R, Verbruggen G, Verdonk PCM. The use of scaffolds in the treatment of osteochondral lesions in the knee: current concepts and future trends. *The journal of knee surgery*. 2012;25(3):179-86.
2. Zscharnack M, Hepp P, Richter R, Aigner T, Schulz R, Somerson J, et al. Repair of Chronic Osteochondral Defects Using Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells in an Ovine Model. *American Journal of Sports Medicine*. 2010;38(9).
3. Bornes TD, Adesida AB, Jomha NM. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Research & Therapy*. 2014;16(5).
4. Zhao Y-h, Yang Q, Xia Q, Peng J, Lu S-b, Guo Q-y, et al. In vitro cartilage production using an extracellular matrix-derived scaffold and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chinese Medical Journal*. 2013;126(16):3130-7.
5. Mrugala D, Bony C, Neves N, Caillot L, Fabre S, Moukoko D, et al. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008;67(3).
6. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Martino A, Marcacci M. Scaffold-Based Repair for Cartilage Healing: A Systematic Review and Technical Note. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2013;29(1):174-86.

- 955 7. Mesallati T, Sheehy E, Buckley C, Kelly D. Tissue engineering scaled-up,  
956 anatomically accurate osteochondral constructs for joint resurfacing. *Journal of*  
957 *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014;8:152-3.
- 958 8. Liao J, Shi K, Ding Q, Qu Y, Luo F, Qian Z. Recent Developments in  
959 Scaffold-Guided Cartilage Tissue Regeneration. *Journal of Biomedical*  
960 *Nanotechnology*. 2014;10(10):3085-104.
- 961 9. Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in tooth  
962 tissue engineering: a review. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*.  
963 2014;8(1):309-15.
- 964 10. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional  
965 articular cartilage: the current status. *Cell and Tissue Research*.  
966 2012;347(3):613-27.
- 967 11. Suarez-Gonzalez D, Lee JS, Diggs A, Lu Y, Nemke B, Markel M, et al.  
968 Controlled Multiple Growth Factor Delivery from Bone Tissue Engineering  
969 Scaffolds via Designed Affinity. *Tissue Engineering Part A*. 2014;20(15-  
970 16):2077-87.
- 971 12. Yang Y, Wu J, Jin G, Li L, Li Z, Li C. Research of osteoblastic induced rat  
972 bone marrow mesenchymal stem cells cultured on beta-TCP/PLLA porous  
973 scaffold. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*.  
974 2015;8(3):3202-9.
- 975 13. Boos AM, Loew JS, Deschler G, Arkudas A, Bleiziffer O, Gulle H, et al.  
976 Directly auto-transplanted mesenchymal stem cells induce bone formation in a  
977 ceramic bone substitute in an ectopic sheep model. *Journal of Cellular and*  
978 *Molecular Medicine*. 2011;15(6).



979 14. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold Design  
980 for Bone Regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.  
981 2014;14(1):15-56.

982 15. Schulz RM, Zscharnack M, Hanisch I, Geiling M, Hepp P, Bader A.  
983 Cartilage tissue engineering by collagen matrix associated bone marrow  
984 derived mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*.  
985 2008;18.

986 16. Ude CC, Sulaiman SB, Ng M-H, Chen H-C, Ahmad J, Yahaya NM, et al.  
987 Cartilage Regeneration by Chondrogenic Induced Adult Stem Cells in  
988 Osteoarthritic Sheep Model. *Plos One*. 2014;9(6).

989 17. Al Fageh H, Hamdan BMYN, Chen HC, Aminuddin BS, Ruszymah BHI.  
990 The potential of intra-articular injection of chondrogenic-induced bone marrow  
991 stem cells to retard the progression of osteoarthritis in a sheep model.  
992 *Experimental Gerontology*. 2012;47(6).

993 18. Rozemuller H, Prins H-J, Naaijken B, Staal J, Buehring H-J, Martens  
994 AC. Prospective Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Mammalian  
995 Species Using Cross-Reacting Anti-Human Monoclonal Antibodies. *Stem Cells*  
996 and Development. 2010;19(12).

997 19. Adamzyk C, Emonds T, Falkenstein J, Tolba R, Jahnen-Dechent W,  
998 Lethaus B, et al. Different Culture Media Affect Proliferation, Surface Epitope  
999 Expression, and Differentiation of Ovine MSC. *Stem cells international*.  
1000 2013;2013:387324-.

1001 20. Endres M, Neumann K, Zhou B, Freymann U, Pretzel D, Stoffel M, et al.  
1002 An ovine in vitro model for chondrocyte-based scaffold-assisted cartilage grafts.  
1003 *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2012;7.

21. Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, Sanz A, Rosa Remacha A, Bolea R, et al. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *Bmc Veterinary Research*. 2012;8.
22. McCarty RC, Xian CJ, Gronthos S, Zannettino ACW, Foster BK. Application of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells to an ovine model of growth plate cartilage injury. *The open orthopaedics journal*. 2010;4:204-10.
23. Reichert JC, Woodruff MA, Friis T, Quent VMC, Gronthos S, Duda GN, et al. Ovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2010;4(7).
24. Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, et al. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2010;46(7):624-34.
25. McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ. Characterisation and Developmental Potential of Ovine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;219(2):324-33.
26. Jiang Y, Xie M, Chen W, Talbot R, Maddox JF, Faraut T, et al. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science*. 2014;344(6188):1168-73.
27. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells [Internet]*. 2012 Pmc3361338; 2012:[12 p.].

- 1029 28. Zannettino ACW, Paton S, Itescu S, Gronthos S. Comparative  
1030 Assessment of the Osteoconductive Properties of Different Biomaterials In Vivo  
1031 Seeded with Human or Ovine Mesenchymal Stem/Stromal Cells. Tissue  
1032 Engineering Part A. 2010;16(12).
- 1033 29. Richler C, Yaffe D. In-vitro cultivation and differentiation capacities of  
1034 myogenic cell lines. Developmental Biology. 1970;23(1):1-22.
- 1035 30. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro  
1036 chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.  
1037 Experimental Cell Research. 1998;238(1):265-72.
- 1038 31. Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nesic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts  
1039 S. A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of  
1040 Human Cartilage Repair: ICRS II. American Journal of Sports Medicine.  
1041 2010;38(5):880-90.
- 1042 32. Sanjurjo-Rodríguez C, Martínez-Sánchez AH, Hermida-Gómez T,  
1043 Fuentes-Boquete I, Blanco FJ, Díaz-Prado S. Human Cartilage Tissue  
1044 Engineering Using Type I Collagen/Heparan Sulfate Scaffolds. Journal of  
1045 Regenerative Medicine. 2014;3(2).
- 1046 33. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT,  
1047 et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose  
1048 tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the  
1049 influence of platelet-rich plasma. Biomaterials. 2010;31(13).
- 1050 34. Jose Martinez-Lorenzo M, Royo-Canas M, Alegre-Aguaron E, Desportes  
1051 P, Castiella T, Garcia-Alvarez F, et al. Phenotype and Chondrogenic  
1052 Differentiation of Mesenchymal Cells from Adipose Tissue of Different Species.  
1053 Journal of Orthopaedic Research. 2009;27(11).

- 1054 35. Fadel L, Viana BR, Tajra Feitosa ML, Mazeto Ercolin AC, Santos Roballo  
1055 KC, Casals JB, et al. Protocols for obtainment and isolation of two  
1056 mesenchymal stem cell sources in sheep. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2011;26(4).
- 1057 36. Jager M, Bachmann R, Scharfstadt A, Krauspe R. Ovine cord blood  
1058 accommodates multipotent mesenchymal progenitor cells. *In Vivo*. 2006;20(2).
- 1059 37. Landa-Solis C, Granados-Montiel J, Olivos-Meza A, Ortega-Sanchez C,  
1060 Cruz-Lemini M, Hernandez-Flores C, et al. Cryopreserved CD90+ cells obtained  
1061 from mobilized peripheral blood in sheep: a new source of mesenchymal stem  
1062 cells for preclinical applications. *Cell Tissue Bank*. 2015.
- 1063 38. Colosimo A, Russo V, Mauro A, Curini V, Marchisio M, Bernabo N, et al.  
1064 Prolonged in vitro expansion partially affects phenotypic features and  
1065 osteogenic potential of ovine amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells.  
1066 *Cytotherapy*. 2013;15(8):930-50.
- 1067 39. Tian Y, Tao L, Zhao S, Tai D, Liu D, Liu P. Isolation and morphological  
1068 characterization of ovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Exp Anim*.  
1069 2015.
- 1070 40. Jahroomishirazi R, Bader A, Ebert S, Schmidt C, Sedaghati B, Schulz-  
1071 Siegmund M, et al. Isolation and Characterization of CD271(+) Stem Cells  
1072 Derived from Sheep Dermal Skin. *Cells Tissues Organs*. 2014;200(2):141-52.
- 1073 41. Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold PM. Ovine periodontal ligament  
1074 stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcified*  
1075 *Tissue International*. 2006;79(5):310-7.
- 1076 42. Song F, Tang J, Geng R, Hu H, Zhu C, Cui W, et al. Comparison of the  
1077 efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells

1078 in the treatment of osteoarthritis in a sheep model. International Journal of  
 1079 Clinical and Experimental Pathology. 2014;7(4):1415-26.

1080 43. Zhao Y, Li T, Wei X, Bianchi G, Hu J, Sanchez PG, et al. Mesenchymal  
 1081 Stem Cell Transplantation Improves Regional Cardiac Remodeling Following  
 1082 Ovine Infarction. Stem Cells Translational Medicine. 2012;1(9):685-95.

1083 44. Somers P, Cornelissen R, Thierens H, Van Nooten G. An optimized  
 1084 growth factor cocktail for ovine mesenchymal stem cells. Growth Factors.  
 1085 2012;30(1):37-48.

1086 45. Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D,  
 1087 et al. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and  
 1088 characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on  
 1089 embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. In  
 1090 vitro cellular & developmental biology Animal. 2010;46(7).

1091 46. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC,  
 1092 Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal  
 1093 cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.  
 1094 Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

1095 47. Cicione C, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I,  
 1096 Diaz-Prado S, Blanco FJ. Alternative protocols to induce chondrogenic  
 1097 differentiation: transforming growth factor-beta superfamily. Cell and Tissue  
 1098 Banking. 2015;16(2):195-207.

1099 48. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective  
 1100 differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. Analytical Biochemistry.  
 1101 2012;425(1):88-90.

- 1102 49. Lindroos B, Aho K-L, Kuokkanen H, Raty S, Huhtala H, Lemponen R, et  
1103 al. Differential Gene Expression in Adipose Stem Cells Cultured in Allogeneic  
1104 Human Serum Versus Fetal Bovine Serum. *Tissue Engineering Part A*.  
1105 2010;16(7):2281-94.
- 1106 50. Grogan SP, Barbero A, Diaz-Romero J, Cleton-Jansen A-M, Soeder S,  
1107 Whiteside R, et al. Identification of markers to characterize and sort human  
1108 articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. *Arthritis  
1109 and Rheumatism*. 2007;56(2):586-95.
- 1110 51. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM,  
1111 et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal  
1112 progenitor cells. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(12):3349-60.
- 1113 52. Martin I, Jakob M, Schafer D, Dick W, Spagnoli G, Heberer M.  
1114 Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from  
1115 normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2001;9(2):112-8.
- 1116 53. Armstrong JPK, Shakur R, Horne JP, Dickinson SC, Armstrong CT, Lau  
1117 K, et al. Artificial membrane-binding proteins stimulate oxygenation of stem cells  
1118 during engineering of large cartilage tissue. *Nature Communications*. 2015;6.
- 1119 54. Aspberg A. The Different Roles of Aggrecan Interaction Domains.  
1120 *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012;60(12):987-96.
- 1121 55. Gupta MC, Theerajunyaporn T, Maitra S, Schmidt MB, Holy CE, Kadiyala  
1122 S, et al. Efficacy of mesenchymal stem cell enriched grafts in an ovine  
1123 posterolateral lumbar spine model. *Spine*. 2007;32(7):720-6.
- 1124 56. El-Jawhari JJ, Sanjurjo-Rodriguez C, Jones E, Giannoudis PV. Collagen-  
1125 containing scaffolds enhance attachment and proliferation of non-cultured bone  
1126 marrow multipotential stromal cells. *J Orthop Res*. 2015.

- 1127 57. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials  
1128 for Tissue Engineering Applications. *Materials*. 2010;3(3):1863-87.
- 1129 58. SC S, Wiedmann-Al-Ahmad M Fau - Kuschnierz J, Kuschnierz J Fau -  
1130 Al-Ahmad A, Al-Ahmad A Fau - Huebner U, Huebner U Fau - Schmelzeisen R,  
1131 Schmelzeisen R Fau - Gutwald R, et al. - Comparative in vitro study of the  
1132 proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic  
1133 biomaterials manufactured for augmentation and reconstruction of tissue or  
1134 bone defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(3):1441-50.
- 1135 59. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based  
1136 assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with  
1137 cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*. 2004;329(1):77-84.
- 1138 60. Perdikouri C, Tagil M, Isaksson H. Characterizing the Composition of  
1139 Bone Formed During Fracture Healing Using Scanning Electron Microscopy  
1140 Techniques. *Calcified Tissue International*. 2015;96(1):11-7.
- 1141 61. Melrose J, Burkhardt D, Taylor TKF, Dillon CT, Read R, Cake M, et al.  
1142 Calcification in the ovine intervertebral disc: a model of hydroxyapatite  
1143 deposition disease. *European Spine Journal*. 2009;18(4):479-89.
- 1144 62. Ozen A, Sancak IG, Von-Rechenberg B, Koch S. Ultrastructural  
1145 Characteristics of Sheep and Horse Mesenchymal Stem Cells. *Microscopy*  
1146 *Research*. 2013;1:17-23.
- 1147 63. Desantis S, Accogli G, Zizza S, Mastrodonato M, Blasi A, Francioso E, et  
1148 al. Ultrastructural study of cultured ovine bone marrow-derived mesenchymal  
1149 stromal cells. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2015;201:43-9.

- 1150 64. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal  
1151 models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells &*  
1152 *Materials*. 2007;13:1-10.
- 1153 65. Lutianov M, Naire S, Roberts S, Kuiper J-H. A mathematical model of  
1154 cartilage regeneration after cell therapy. *Journal of Theoretical Biology*.  
1155 2011;289:136-50.
- 1156 66. Fuentes-Boquete IM, Arufe Gonda MC, Díaz Prado SM, Hermida Gómez  
1157 T, de Toro Santos FJ, Blanco FJ. Cell and Tissue Transplant Strategies for  
1158 Joint Lesions. *The Open Transplantation Journal*. 2008;2:21-8.

1159



Figure 1

[Click here to download Figure Fig. 1.tif](#)

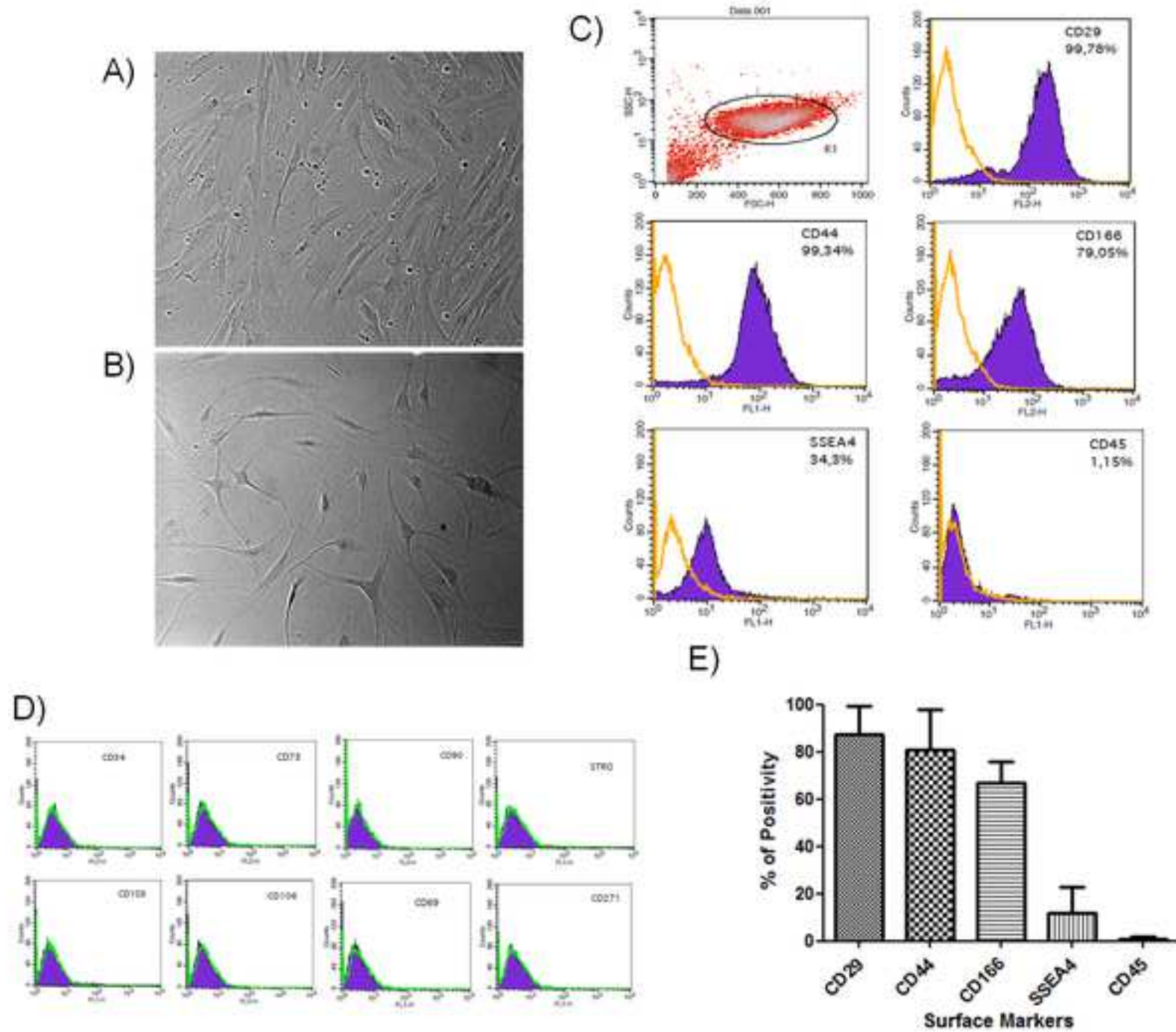


Figure 2

[Click here to download Figure Fig. 2.tif](#)

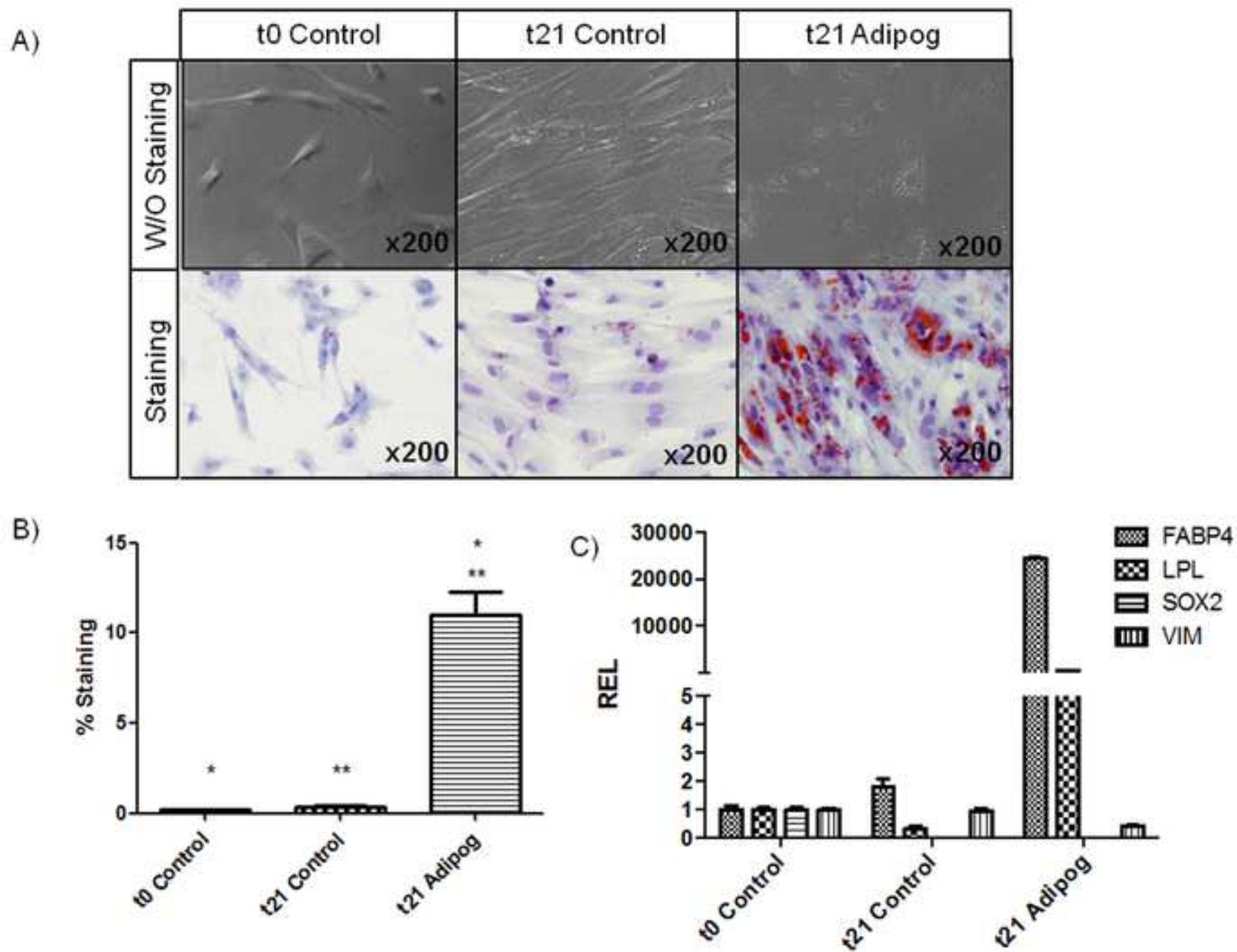


Figure 3

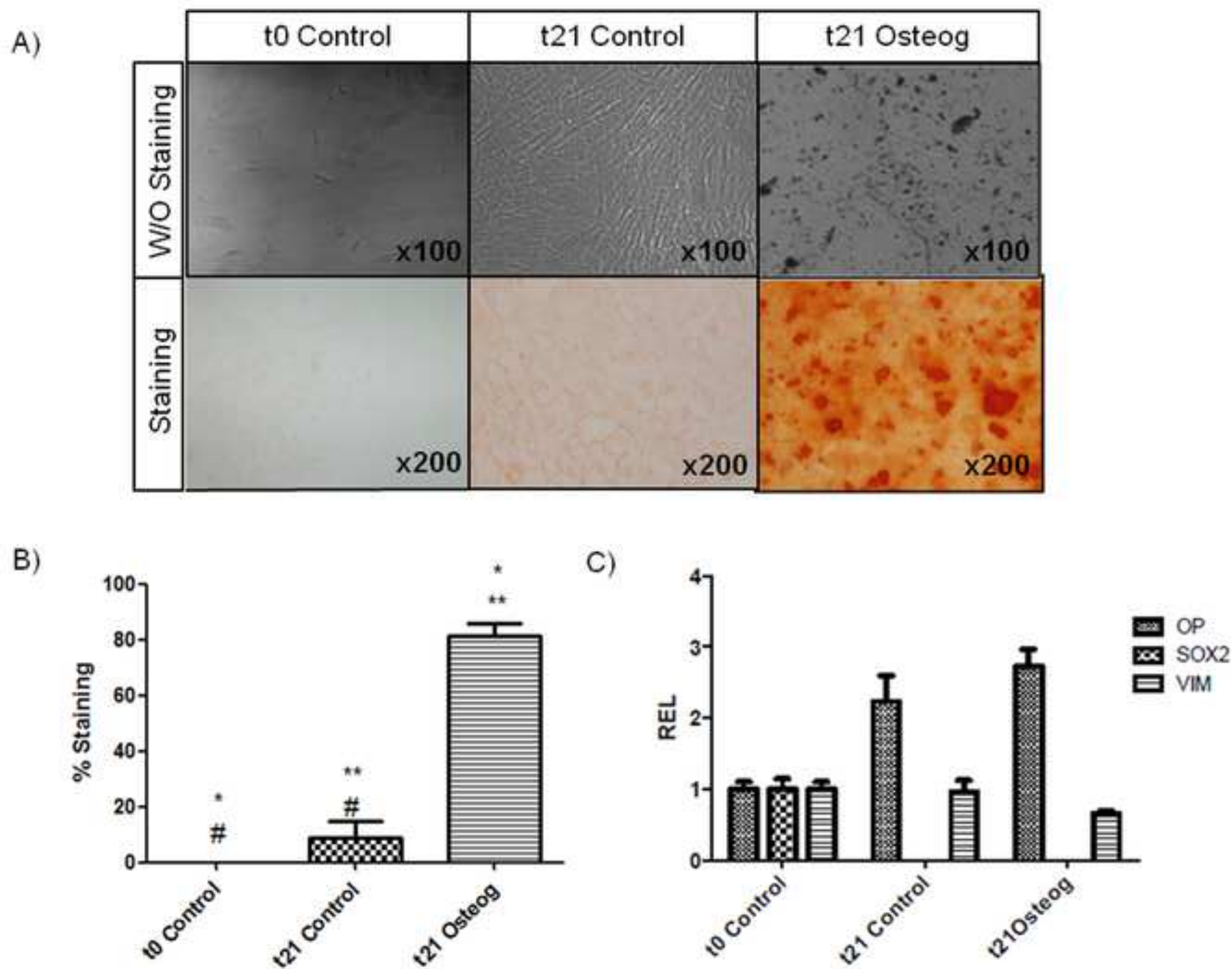




Figure 4

[Click here to download Figure Fig. 4.tif](#)

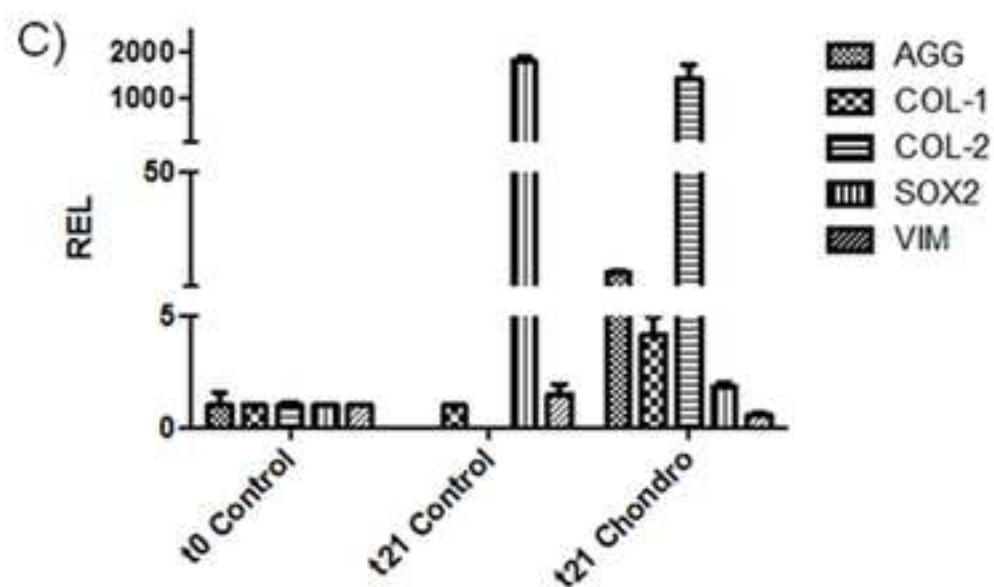
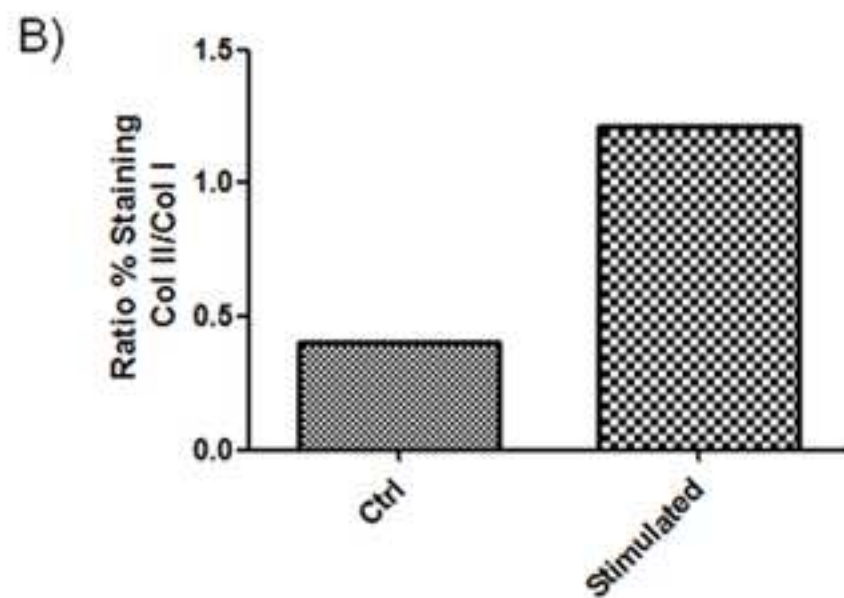
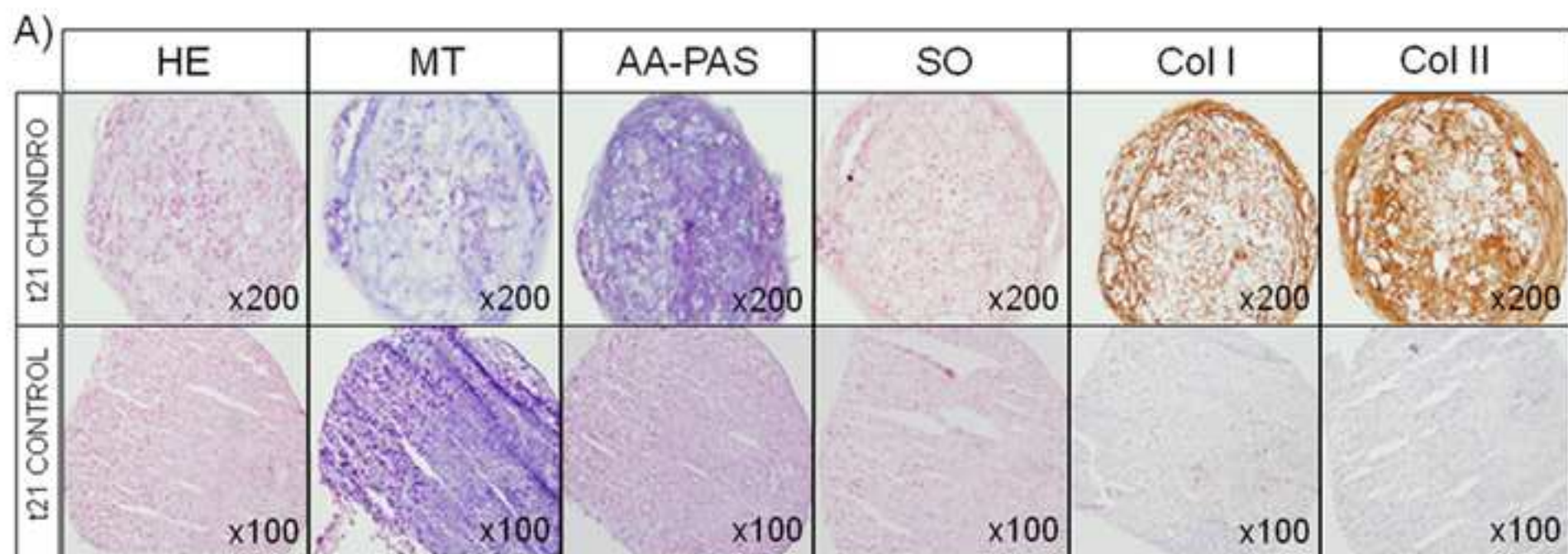


Figure 5

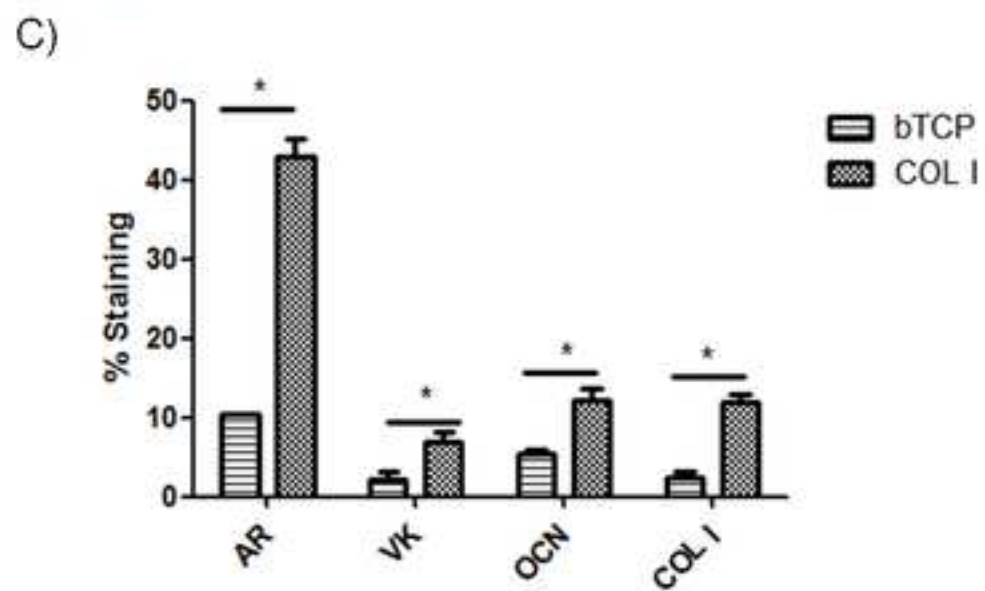
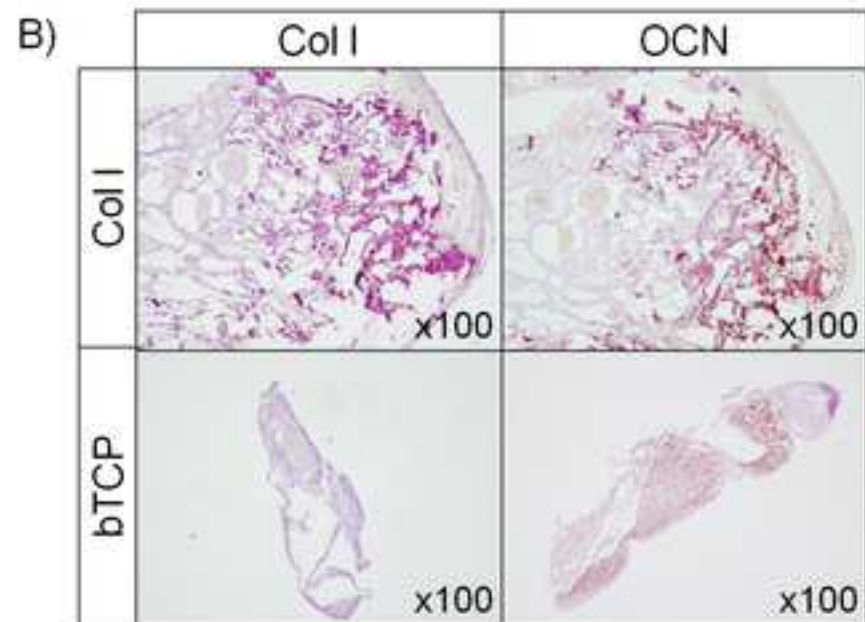
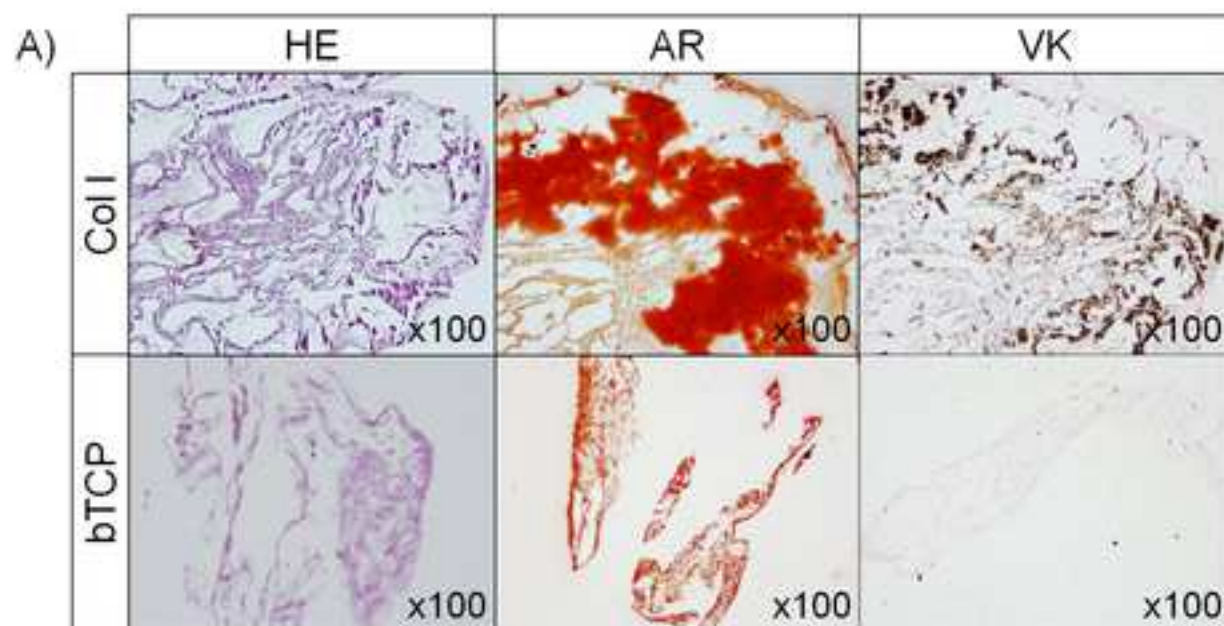
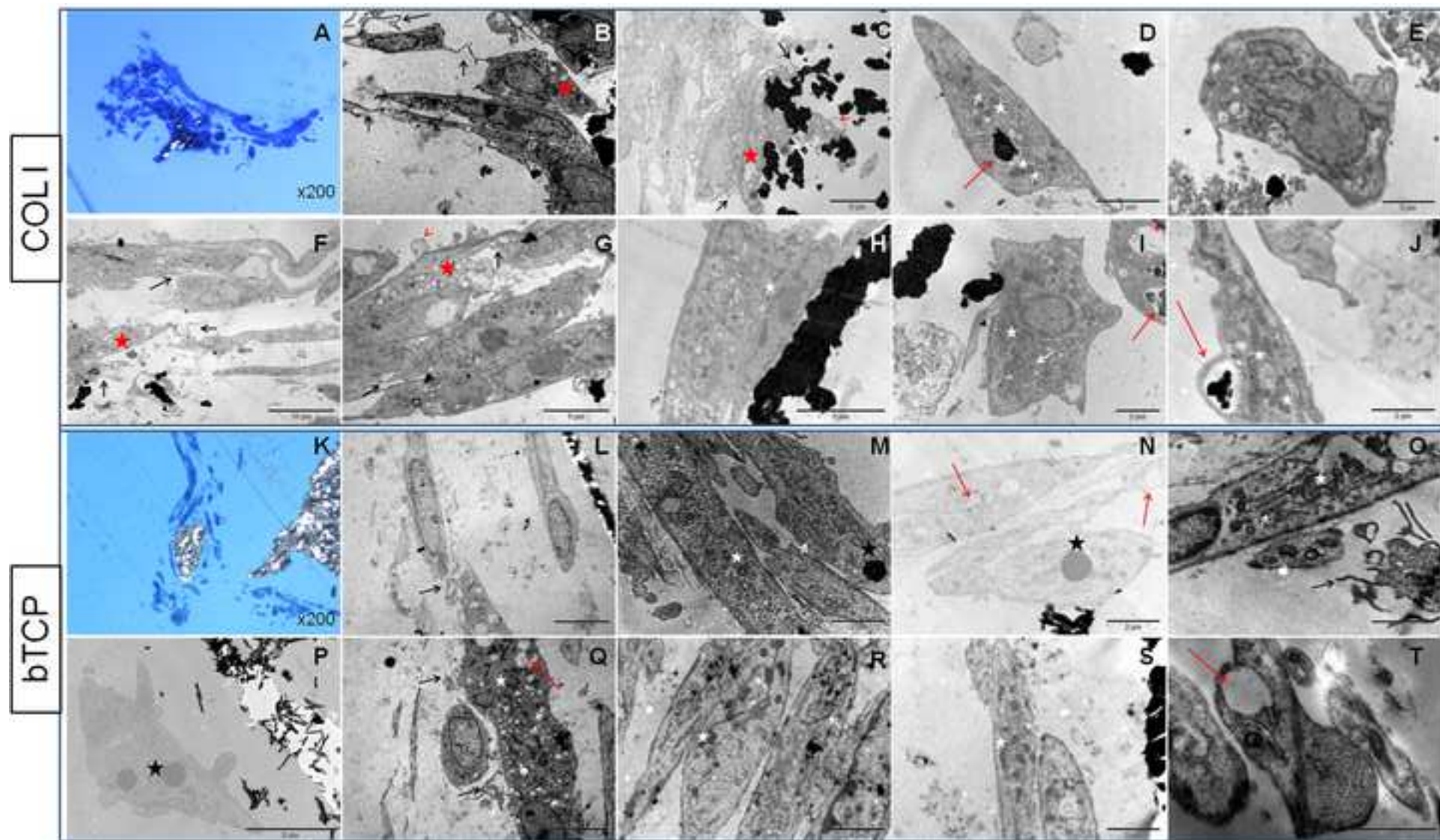




Figure 6



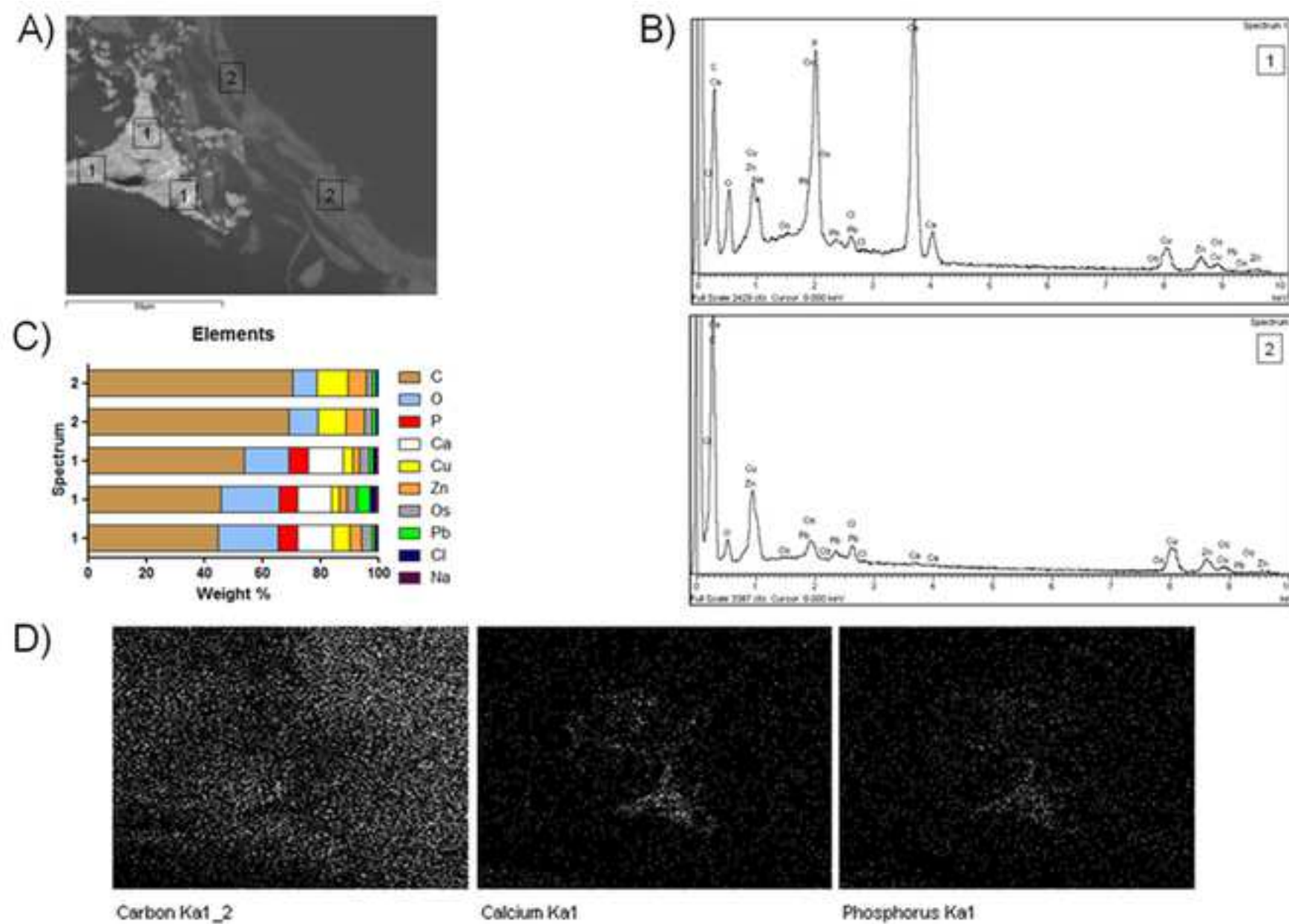
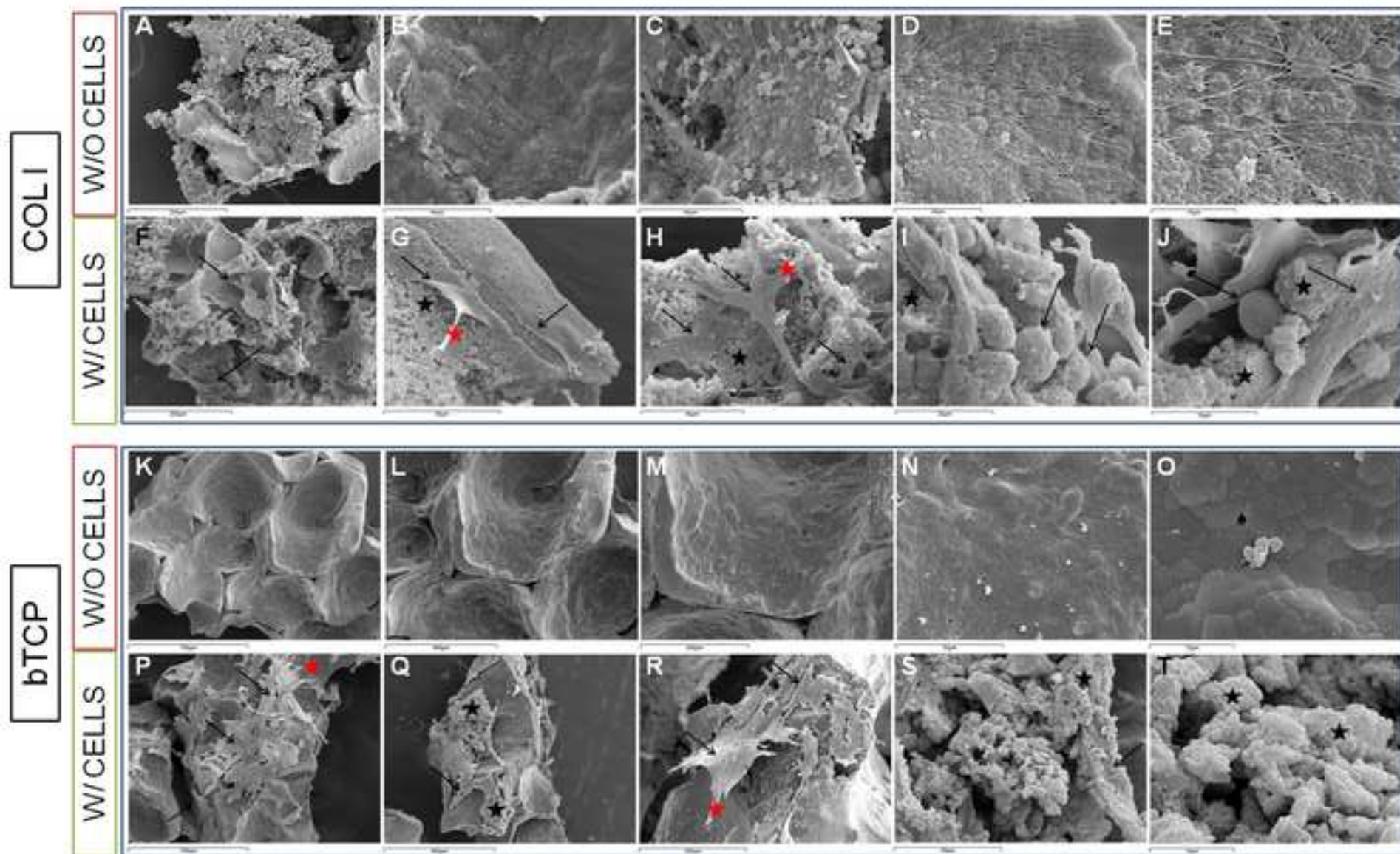


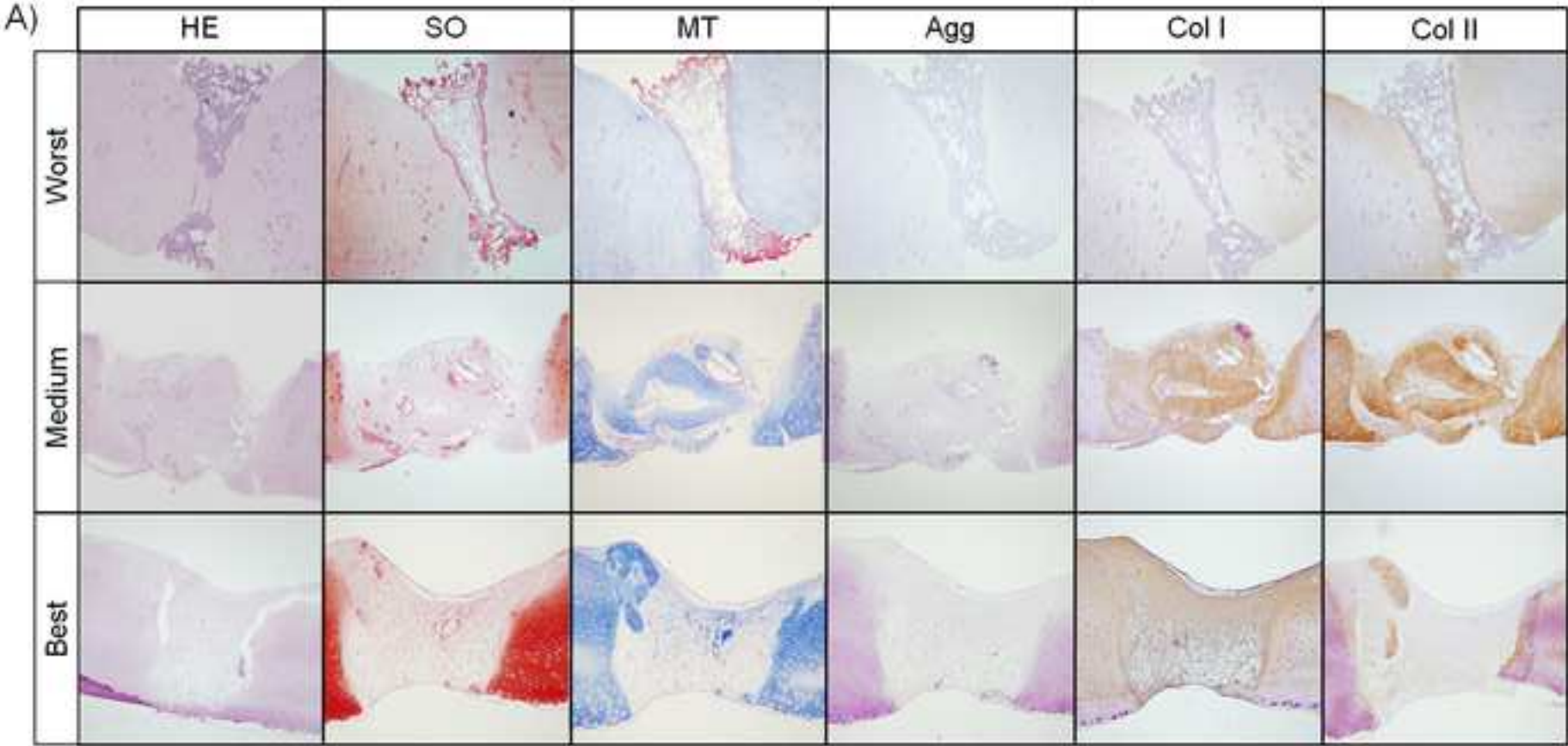


Figure 8

[Click here to download Figure Fig. 8.tif](#)







B) Modified ICRS II Scale

Histological Parameter	Worst	Medium	Best
Tissue morphology	0%	25%	60%
Matrix staining	0%	15%	35%
Cell morphology	10%	50%	55%
Chondrocyte clustering	100%	100%	100%
Surface architecture	5%	50%	80%
Basal integration	0%	75%	90%
Overall assessment	19%	52%	70%



## **Chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in bioactive scaffolds.**

Sanjurjo-Rodríguez C.<sup>1,3,7</sup>, Ferrer R.<sup>2</sup>, Mora-Castilla S.<sup>2,3</sup>, Sánchez-Danés A.<sup>8</sup>, Lebourg M.<sup>3,4</sup>, Mateos Timoneda M.A.<sup>3,6</sup>, Ochoa I.<sup>3,5</sup>, Díaz-Prado S.<sup>1,3,7</sup>, Gómez J.L.<sup>3,4</sup>, Monléon M.<sup>3,4</sup>, Doblaré M.<sup>3,5</sup>, Planell J.A.<sup>3,6</sup>, Blanco F.J.<sup>1,3,7</sup>, Consiglio A.<sup>8,9</sup>, Raya A.<sup>2,3,10</sup>

1. Cell Therapy and Regenerative Medicine Group, University of A Coruña, A Coruña, Spain.
2. Control of Stem Cell Potency Group, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, Spain.
3. Center for Networked Biomedical Research on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN).
4. Center for Biomaterials and Tissue Engineering, Valencia (CBIT-UPV), Spain.
5. Grupo GEMM / I3A, Zaragoza, Spain.
6. Bio/non-bio Interactions for Regenerative Medicine Group, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, Spain.
7. Bioengineering Group of Tissue and Cellular Therapy, Biomedical Research Institute from A Coruña (INIBIC), A Coruña, Spain.
8. Institute for Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain.
9. Department of Biomedical Science and Biotechnology, University of Brescia, Brescia, Italy.
10. Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA).

## 1. Introduction

Hyaline cartilage is a well-structured and specialized tissue composed by mature chondrocytes that are responsible for secretion of a complex extracellular matrix (ECM) of proteoglycans (PG) and collagens (Col), mainly type II Col (Col II), giving to hyaline cartilage its strength and structure (1, 2). Because of the lack of progenitor cells and vasculature, articular cartilage has a poor capacity for repair (1, 3). The degradation of the ECM or impairment of chondrocyte function can result in loss of tissue function and lead to osteoarthritis (OA) (4-6).

OA is a heterogeneous disorder where the molecular abnormalities could precede the anatomic and physiologic disease and illness manifestations, until a final clinical stage that usually overcomes the joint replacement (6). For this reason, many efforts are actually under research, just to find the best option for recover articular cartilage function. Between the strategies applied to solve this problem, some of them rely on cell-based therapies; others involve materials engineered with bioactive chondrogenic factors, and most innovative is the combination of both: biomaterials that have been seeded with chondrocytes or progenitor cells (7). Nevertheless, these cells are really instable in monolayer culture (2) and also show induction of immune response after allograft transplantations (8). Other sources of cells have been broadly used for cartilage tissue engineering, including mesenchymal stem cells (MSC) and pluripotent cells.

MSCs have been obtained from different adult sources including adipose tissue (9, 10), bone marrow (11, 12), amniotic membrane (13) and other tissues (14-

16). Harvesting of MSC sometimes is limited and requires invasive procedures. In some cases, adult MSC retain some fibroblastic characteristic after induction or they lead less robust and /or hypertrophic cartilage (10, 12). Moreover, age-related molecular mechanisms can lead in a progressive decline in number and regenerative functions of resident stem cells (17). This can be a problem in illness like OA with a high incidence rate in elderly population.

Some other reports have shown the usefulness of pluripotent cells as candidates for cartilage tissue engineering (18-24). Especially, iPS cells, avoids problems related with immune rejection and ethical concerns. Nevertheless, it is necessary to explore safety issues such as mutagenesis and tumorigenesis of iPS-derived cells. In fact, some studies have emphasized the role of pre-differentiation of pluripotent cells towards multipotent progenitors before chondrogenic commitment (20, 23-25).

On the other hand, biological environments that instruct cell fate transitions through chondrogenic phenotype are especially important for proper cartilage differentiation. In fact, different techniques that mimic 3D environments have been old –used for chondrogenic differentiation of MSC using micromass cell-pellet systems (18, 25-27). Actually, many different biomaterials of natural or synthetic origin are used for the 3D differentiation of MSC into chondrogenic cells for cartilage tissue engineering (28).

The aim of this work is to optimize the derivation of iPS cells for chondrogenic repair. In this work, we show the chondrogenic capacity of pseudoclonally derived MSC obtained from human iPS cells. We observe that bioactive scaffolds improve the chondrogenic phenotype, demonstrating that

bioconstructs are an effective approach for differentiation of MSC derived from iPS (MLC) and an alternative for treatment of articular disorders.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Sample collection**

MSCs isolated from subcutaneous adipose tissue were used as control in the multipotent differentiation assays. For iPS cells (iPSCs) generation, epidermal keratinocytes were reprogrammed with retroviruses following a previously described protocol (29). The iPSCs lines generated were characterized before use as described (29). Sample procurement was done with written informed consent under the protocols previously approved by the institutional review board and consistent with the principles of the Declaration of Helsinki. The generation of human iPSCs was done following a protocol approved by the Spanish competent authorities (Commission on Guarantees concerning the Donation and Use of Human Tissues and Cells of the Carlos III Health Institute).

### **2.2. Cell culture**

MSCs were maintained in EB medium (EBm), consisting of knockOut-Dulbecco's modified Eagle medium (KO-DMEM; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% of foetal bovine serum (FBS; Hyclone-GE Healthcare, Utah, USA), 2 mM Glutamax (Glx, Gibco), 50 mM 2-beta-mercaptoethanol (Gibco), 1% non-essential aminoacids (NEAA; Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (P/S; Gibco). iPSCs were cultured in human ES (hES) medium, consisting of KO-DMEM supplemented with 20% KO-Serum Replacement (KO-Sr; Gibco), 2 mM Glx, 50 mM 2-beta-mercaptoethanol, 1%

NEAA, 1% P/S and 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Peprotech, Nueva Jersey, USA). iPSCs cultures were maintained onto human foreskin fibroblasts (HFFs) feeder layer at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, with media changes every day. Colonies were split manually and adapted onto Matrigel (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)-coated plates with hES pre-conditioned medium derived from filtered supernatant of mouse embryonic fibroblasts cultures (MEFs) with 10 ng/ml of bFGF.

### 2.3. Non-clonal derivation of mesenchymal stem cell-like cells (MLCs)

Pluripotent colonies on matrigel were subjected to embryoid bodies (EBs) formation by dissociation in small clusters and deriving homogeneous size by centrifugation in 96 well plate (w/p) with “V” bottom (Corning Inc., New York, USA). After 24 hours, EBs were cultured with EBm in non-adherent cell culture plates (Corning Inc.) to form aggregates. After 2 days in suspension, EBs were transferred into 6 w/p gelatin-coated plates and cultured until outgrowths reach complete confluence. Cells were serially passaged at 1:3 ratio to obtain an homogeneous monolayer of non-clonal MSC-like cells (NC-MLCs). Several NC-MLC were derived from the same iPS cell line, in consecutive passages.

### 2.4. Pseudo-clonal derivation of MLCs

In order to avoid problems arising from cellular heterogeneity, we established a pseudo-clonal derivation method in which each EB was independently transferred into 24 w/p gelatin-coated plates. Single EB was clonally expanded to obtain an homogeneous monolayer of pseudo-clonal MLCs (C-MLC).

## 2.5. Analysis of surface markers by flow cytometry

Surface marker analysis of MSCs, C-MLC and NC-MLC, maintained in EBm until passages 5-8, was performed by flow cytometry for a panel of typical surface markers of human MSCs. Cells were harvested using 0.05% Trysin-EDTA (Gibco) and washed twice in PBS. Briefly, cell pellets were resuspended in blocking medium containing PBS and 1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells ( $1 \times 10^5$ ) were labeled with the specific fluorochrome-conjugated antibodies (Supplementary Figure 1). Isotypic antibodies were used as a control. At least 10,000 events were acquired for each sample using a Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Barcelona, Spain).

## 2.6. Differentiation potential

### 2.6.1. Adipogenic differentiation

Cells were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well on 6 w/p culture plates and allowed to differentiate for 21 days in adipogenic medium containing alpha-MEM (Gibco) supplemented with 10% FBS, 1  $\mu$ M dexamethasone (Dex; Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ M indomethacin (Sigma-Aldrich), 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g/mL insulin (Sigma-Aldrich) and 1% P/S. Medium was changed every 3 days. Differentiation potency was evaluated microscopically (Leica DMIL LED, Leica, Wetzlar, Germany) by Oil Red O staining and lineage specific gene expression pattern (Adiponectin (APM1), Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and Lipoprotein lipase (LPL)) by quantitative real time PCR (qRT-PCR).



### *2.6.2. Osteogenic differentiation*

Cells were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well on 6 w/p culture plates and induced with osteogenic differentiation medium containing alpha-MEM supplemented with 10% FBS, 50  $\mu$ M L-ascorbic acid (AA; Sigma-Aldrich), 100 nM Dex, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich) and 1% P/S for 21 days. Medium was changed every 3 days. Mineral deposition was detected by Alizarin Red staining (Leica MZ10 F) and the lineage specific gene expression pattern (Alkaline phosphatase (ALP), Osterix (SP7) and Osteopontin (SPP1)) was analysed by qRT-PCR.

### *2.6.3. Chondrogenic differentiation*

Micromass cell-pellets ( $2.5 \times 10^5$  cells/tube) were differentiated in polypropylene Falcon tubes (Corning Inc.) with chondrogenic medium containing high glucose DMEM with L-glutamine and sodium pyruvate (Gibco) supplemented with 1% KO-Sr, 2 mM Glx, 1% P/S, 40 mg/mL proline (Sigma-Aldrich), 1% ITS+Premix (Gibco), 50 mg/mL AA, 100 nM Dex and 10 ng/ml transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1; Peprotech). Medium was changed every 3 days for 21 days of differentiation. Chondrogenic differentiation was evaluated by specific staining on 5  $\mu$ m-paraffin embedding sections, Safranin-O (SO) for PG and Masson's trichrome (MT) for Col, and lineage specific gene expression (COL2, Hyaluronan and PG link protein 1 (HAPLN1) and Aggrecan (ACAN)), and non-specific as COL 1.

### *2.6.4. Endothelial cell differentiation*

Cells were seeded at a density of  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and induced with endothelial

cell (EC) differentiation medium (M-199 supplemented with 10 ng/ml bFGF and 50 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF, Peprotech) for 7 days. The acquisition of the EC phenotype was evaluated in Matrigel *in vitro* tube formation assay and specific EC markers expression (Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1), CD34, Endoglin (ENG), Vascular endothelial growth factor receptor 1 (FLT1) and 2 (KDR) and von Willebrand factor (vWF)). Total length of tubular structures was quantified with ImageJ 1.48p software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## 2.7. HUVEC angiotube formation assay

Matrigel-based angiotube formation assay with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was employed to assess the paracrine pro-angiogenic potential of cells. Conditioned medium was collected from cell cultures (passage 4) and *in vitro* EC differentiation, centrifuged at 1200 rpm for 10 min and frozen at -80°C. HUVECs were seeded in 96-well plate pre-coated with growth factor reduced matrigel at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well using HUVEC growth medium (IMDM medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 1% P/S, 20 ng/ml VEGF, 5 ng/ml bFGF, 1ng/ml AA, 20 ng/ml Insulin-like growth factor 1 (IGF-1; Peprotech), 5 ng/ml Epidermal growth factor (EGF; Peprotech) and 90 ng/ml heparin (Sigma-Aldrich)) supplemented with conditioned medium (1:1). HUVEC growth medium served as positive control and EBm and EC differentiation medium were used as a negative control. Cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 21% O<sub>2</sub> for 6h to allow the formation of tubes. Total length of tubular structures was quantified using ImageJ 1.48p software. Each condition was assessed in quadrupled.

## 2.8. Preparation and post-modifications of scaffolds

### 2.8.1. PCL scaffolds

Polycaprolactone (PCL) scaffolds were prepared using a mixed phase separation-porogen leaching technique as described previously (30). Shortly PCL (Polysciences, Eppelheim, Germany) solution (20% w/w) in dioxane (Scharlau, Barcelona, Spain) was mixed with acrylic microspheres (Elvacite, Lucite International, Hampshire, United Kingdom) in a Teflon mould and immediately quenched in liquid nitrogen. Frozen dioxane was eliminated in cold ethanol at -20°C during three days and subsequently porogen spheres were eliminated by repeated washes in warm ethanol (40°C). PCL scaffolds of 5mm diameter were punched out of the disks and adjusted to height 1.5mm. PCL scaffolds were dried to constant weight and irradiated with 25kGy gamma ray. Subsequently, PCL scaffolds were modified using divinylsulfone crosslinked hyaluronan (PCLHA) following a previously determined strategy (31). Hyaluronan solution in sodium hydroxide (2% w/v in 0.2M NaOH, both from Sigma-Aldrich) was injected inside of the scaffolds under vacuum and crosslink was realized using a 4:1 molar ratio of divinylsulfone (Sigma-Aldrich) to HA hydroxyl moieties. Reaction was carried out during 2h. Modified PCL scaffolds were extensively washed with water and with ethanol-water mix in order to eliminate unreacted divinylsulfone. PCL scaffolds were freeze-dried and sterilized with ethanol 70% before cell culture.

### 2.8.2. PLA scaffolds

Poly(lactic acid) (PLA) scaffolds were fabricated using the solvent casting/salt leaching technique following previously published procedures (32). In brief, 5%

(w/v%) PLA solution in chloroform was mixed with sieved sodium chloride (NaCl) measuring 80–210  $\mu\text{m}$ , and if needed glass particles at 50-wt%, measuring less than 40  $\mu\text{m}$ . The paste was cast into cylindrical Teflon moulds (6 mm diameter, 12 mm length) until complete chloroform evaporation. Cylindrical samples were punched out of the moulds and placed in distilled water for 48 h. After that, the NaCl particles have been leached out of the cylinders and left behind a porous network. For the reinforcement of the scaffolds and to provide bioactivity, soluble CaP glass particles in the system  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-TiO}_2$  were used (PLAG5). The glass, coded G5, had an equimolar composition of  $\text{P}_2\text{O}_5$  and CaO (44.5%), 6%  $\text{Na}_2\text{O}$  and 5%  $\text{TiO}_2$ . For the preparation of the glass,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$ , and  $\text{TiO}_2$  were homogeneously mixed in a platinum crucible. The mixture was heated at 1350°C for 3 h and cast on a metallic preheated plate. After that, the glass was annealed at its glass transition temperature (533°C). Finally, the glass plates were pulverized in an agate planetary mill and sieved. Glass particles under 40  $\mu\text{m}$  were obtained. Scaffolds were sterilized with ethanol 70% before cell culture.

## 2.9. Culture of cells on scaffolds

Before seeding, scaffolds were rehydrated in chondrogenic medium for 24 hours.  $5 \times 10^5$  of MSC, C-MLC and NC-MLC were seeded per scaffold in chondrogenic medium during 21 days. Medium was changed every 2-3 days. Chondrogenic constructs were washed twice in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for immunohistochemical analyses and washed, cut with a scalpel and frozen at -80°C for gene expression analyses.

## 2.10. Mechanical properties

To analyse the mechanical properties of the constructs, we studied the confined deformation modulus between MSC and C-MLC, and we compared results at 1% of deformation. All results were normalized with non-seeded scaffolds. Results were calculated as the percentage of force applied to deform the construct 1%.

## 2.11. Gene expression

Total RNA was isolated from adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiated cells and constructs using TRIzol (Invitrogen, California, USA) and from undifferentiated and endothelial differentiated cells using RNeasy mini isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to manufacturer's protocols. cDNA were synthesised using SuperScript III Reverse Transcriptase Synthesis Kit (Invitrogen).

qRT-PCR analyses were done with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) in StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using primers (Supplementary Figure 3) and Taqman (Supplementary Figure 4). Gene expression assays were done using the Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

Results were calculated in the qBase software (Primerdesign Ltd, Southampton, UK) as relative expression levels (REL). All expression analyses were normalized with Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

## 2.12. Immunostainings

Fixed constructs from MSC and C-MLC were cut in 1 mm sections. After overnight permeabilization with Tris-Buffered saline (TBS) with 0.5% triton and 6% donkey serum, constructs were stained for two days at 4°C using mouse anti-human chondroitin sulfate (CS, 1:400; Sigma-Aldrich) and mouse anti-human Col II (1:100; Chemicon, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in TBS supplemented with 0.1% Triton and 6% donkey serum. Secondary antibodies used were donkey anti-mouse IgM-Cy3 (1:200; Jackson Research) and donkey anti-mouse IgG-Cy3 (1:100; Jackson Research). After 2 days of secondary antibody staining at 4°C, sections were washed and stained with 0.5 mg/ml of DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) for 5 min and then mounted with PVA/DABCO. Images were obtained using a Leica SP5 confocal microscope.

## 3. Results

### 3.1. Non-clonal multipotent assays

To study the multipotent phenotype of the NC-MLC, we induced them to tri-lineage differentiation to adipogenic, osteogenic and chondrogenic cell-derivatives. As a control, we assayed the multipotent differentiations of adult human adipose derived MSC.

After 21 days of differentiation, NC-MLC were weakly positive for Oil Red O staining while MSC acquired a typical adipocyte-like morphology and showed abundant accumulation of lipid vacuoles positive for Oil Red O (Figure 1A). In addition, MSC expressed highly typical adipogenic genes as APM1 ( $50.51 \pm 1.94$ ), LPL ( $43.17 \pm 0.29$ ) and PPARY ( $238.9 \pm 13.40$ ). On the other hand,

NC-MLC did not express APM1 ( $0.53\pm0.32$ ) and LPL ( $0.50\pm0.26$ ) but started to express PPARY ( $62.89\pm35.80$ ) (Figure 1B).

Regarding to osteogenic differentiation NC-MLC and MSC were highly positive for Alizarin Red staining (Figure 2A) but NC-MLC had more expression of osteogenic genes (ALP, SPP1 and Sp7) than MSC (Figure 2B).

To test the chondrogenic potencial, histological analysis of NC-MLC and MSC micromass cell-pellets shown collagen staining by MT and PG staining by SO (Figure 3A). However, MSC showed higher REL of ACAN ( $3.93 \pm 0.94$ ) and HAPLN1 ( $5.68\pm0.26$ ) than NC-MLC ( $1.25\pm0.25$  and  $1.16\pm0.08$ , respectively). Also, the COL2/COL1 ratio is 2.6 times bigger in MSC than in NC-MLC (Figure 3B).

### 3.2. Expression profile of cell surface markers

Homogeneous monolayers of large fibroblast-like cells were found both in the NC-MLC and in the C-MLC cultures. To compare these cells with MSC we analysed the expression profile of cell surface markers characteristic of adult human MSC. NC-MLC and C-MLC were similar to MSC for CD29 (>98%), CD44 (>94%) and CD73 (>99%) (Figure 4). In regards to CD90 all cell types were higher than 98.00% except NC-MLC1 (62.64%); and regarding to CD105 MSC, NC-MLC2 and C-MLC2 were higher than 98.00% but NC-MLC1 was 86.76% and C-MLC1 was 77.32%. MSC, NC-MLC and C-MLC all were negative for the hematopoietic marker CD34. Furthermore they were negative for CD271, except NC-MLC1 (7.19%) (Figure 4).

### 3.3. Pseudo-clonal multipotent assays

C-MLC differentiations were compared with MSC and NC-MLC ones.

C-MLC adipogenic differentiation was not identified neither by Oil Red O staining (Figure 5A) nor by high expression of adipogenic genes (APM1, LPL, PPARY) (Figure 5B).

By Alizarin Red staining C-MLC presented few phosphate-calcium deposits weakly stained (Figure 6A). REL of ALP, SPP1 and Sp7 were similar in MSC ( $0.86\pm0.00$ ;  $1.73\pm0.02$ ;  $3.79\pm0.12$ , respectively) and C-MLC ( $0.79\pm0.18$ ;  $1.19\pm0.11$ ;  $2.89\pm1.16$ , respectively) (Figure 6B). On the other hand, NC-MLC showed higher REL of ALP ( $4.65\pm1.74$ ), SPP1 ( $6.16\pm3.51$ ) and Sp7 ( $10.04\pm7.68$ ) (Figure 6B).

After 21 days of chondrogenesis, micromass cell-pellets from MSC were more intense and homogeneous stained with MT than MLC (Figure 7A). In fact, MSC presented the better COL2/COL1 ratio (Figure 7B). C-MLC and NC-MLC showed stronger staining with MT and SO in the periphery than in the central zone of the micromass cell-pellet (Figure 7A). Nevertheless, C-MLC REL of ACAN ( $6.91\pm2.57$ ) and HAPLN1 ( $4.66\pm0.42$ ) were similar to MSC REL ( $4.62\pm1.10$ ;  $5.68\pm0.26$ , respectively) and were higher than NC-MLC ( $1.47\pm0.29$ ;  $1.16\pm0.08$ ) (Figure 7B).

To investigate the EC differentiation potential of NC-MLC and C-MLC, we measured the expression of specific markers and capillary-like tube formation in matrigel and we compared with MSC. Both MLC types were able to differentiate into EC, showing an increase in expression of the endothelial markers after EC differentiation. However, the pattern of expression showed that the EC



differentiation potential of NC-MLC was higher. The differentiation ratio reached significance for CD34, CD105, VEGFR1, VEGFR2 and TGF $\beta$ 1 compared to MSC (Figure 8A). Three differentiated groups were able to develop capillary-like networks (Figure 8B), and, although the quantification of total length of the tubes showed no significant differences between groups, interestingly, the ability of C-MLC was higher (Figure 8C).

In order to test pro-angiogenic paracrine effects of MLC, a matrigel-based HUVECs tube formation assay was performed (Figure 8D). When we analysed the effect of the conditioned medium from EC differentiation on the capillary-like tube formation of HUVECs, we found that conditioned medium from C-MLC and NC-MLC induced a significantly increased formation of angiotubes compared with control culture medium and conditioned medium from MSC. When HUVECs were incubated with conditioned medium from expansion cultures, an antiangiogenic effect was observed derived from MSC compared with positive control (Figure 8E). In agreement with the functional observations, MSC presented a significant higher expression level of the antiangiogenic molecule THBS1 (Figure 8F).

### 3.4. Biomechanical properties of bioconstructs

Variations in mechanical properties were observed between different bioconstructs from MSC and C-MLC in various scaffolds, taking the value 100% as the control (scaffold without cells). PLA constructs from MSC ( $98.39 \pm 65.43$ ), C-MLC1 ( $64.47 \pm 22.84$ ) and C-MLC2 ( $52.83 \pm 21.30$ ) needed less percentage of force to deform itself 1%, that could indicate degradation of scaffold and absence of ECM (Figure 9). PLAG5 constructs also had lower percentage than

free-cell controls, except in constructs of C-MLC2 ( $116.8 \pm 57.67$ ). PCL and PCLHA constructs both showed high percentages except in constructs of MSC, being PCLHA constructs the highest ones, that could indicate a big accumulation of ECM. Constructs from pseudoclones in PCLHA showed better mechanical properties than MSC ones (Figure 9).

### 3.5. Chondrogenic analysis of PCL bioconstructs

To confirm ECM production in bioconstructs, we stained thin portions of bioconstructs with antibodies against Col II and CS, markers of hyaline mature cartilage. We compare between pseudoclonal MLC and MSC, providing both strong immunostaining for Col II and CS (Figure 10A). Confocal images show cells with high ECM content and compactly clustered in pores of PCL scaffolds.

Molecular biology experiments confirmed the expression of all chondrogenic genes in these biomaterials. PCLHA bioactive scaffolds enhance higher expression of chondrogenic genes Col 2, HAPLN1 and ACAN than non-bioactive PCL constructs (Figure 10B), after chondrogenic differentiation.

Despite minor differences in expression, both pseudoclones showed higher REL than MSC (Figure 10B). Col 2 in PCLHA constructs from MSC ( $4.69 \pm 1.28$ ) were slightly less expressed than from C-MLC1 ( $14.81 \pm 10.05$ ) and C-MLC2 ( $21.73 \pm 12.95$ ); the same pattern happened with HAPLN1 ( $15.07 \pm 5.13$ ;  $22.39 \pm 7.64$ ;  $36.97 \pm 7.25$ ; respectively) and ACAN ( $7.41 \pm 6.29$ ;  $9.43 \pm 0.09$ ;  $10.75 \pm 4.42$ ; respectively) (Figure 10B).

## 4. Discussion

Some reports have suggested that age and cell potency state of MSC could be limiting factors for correct chondrogenic differentiation (12). In contrast,

pluripotent cells could provide an unlimited number of specialized cells. In fact, pluripotent cells of embryonic (18-20, 25) or induced to pluripotency (21, 22, 24) origin have shown to produce cartilage in specific conditions.

iPS cells seem to be an alternative tool to MSC for cartilage repair except for the risk of teratoma formation in cell therapy or tissue engineering. Deriving MLC from hES (33, 34) and iPS (23, 34-36) we could avoid both, the risk of teratomas and the problem of in vivo-age-dependent and in vitro-passage-dependent MSC senescence (17, 37). Even though MLC show similar gene expression profile than MSC (36), they did not present immunomodulation properties (33, 36). This may be not a problem in the case of iPS because of the use of derived MLC from the own's patient reprogrammed adult cells.

In the literature it was described the derivation of MLC from iPS with (21, 24, 35, 38) or without (23) EB formation. From EB formation, some authors have established derivation of MLC from iPS cells by bulk EBs outgrowth (NC-MLC) followed by serial splitting and further chondrogenic differentiation in micromass cell-pellet conditions (21, 24); Liu *et al* (38) have derived and expanded murine MLC from independent EBs. Here we compared the multipotent capacity of NC-MLC with the MSC one. Some authors found multipotent differentiation of MLC from iPS (23) but these results were not compared with MSC; neither other authors (36) nor us found adipogenesis of MLC. It could be possible that these cells followed the specific fate to osteo-chondro progenitors.

In the same way that MSC isolated from their niches are heterogeneous populations and in previous reports, it was established the usefulness of minimize this cellular heterogeneity without limiting multipotent capacities and chondrogenic aptitudes in artificial conditions (16, 20, 23-25, 39). To avoid

these problems arising from cellular heterogeneity between EBs we grow each one independently, until generation of C-MLC. Single EBs were pseudoclonally expanded and after some rounds of splitting an homogeneous monolayer of MLC were obtained. Despite minor differences in cell morphology, we selected two clones (C-MLC1 and C-MLC2) due to their high proliferating and good growth capacities. Although we did not observe differences in cell surface marker expression between NC-MLC and C-MLC, we obtained higher chondrogenic capacity when we reduced this heterogeneity. However, it seems that the more heterogeneity there is, the more osteogenic capacity these cells present. Furthermore, NC-MLC showed higher endothelial differentiation capacity and pro-angiogenic effects, that make them an interesting cell type for osteogenesis.

Several authors characterized MLC by flow cytometry and they found that were highly positive for CD166 (23, 34, 35), CD73 (23, 34-36), CD29 (34-36), CD44 (34) and negative for hematopoietic markers as CD34 (23, 35, 36).

CD105 was highly expressed in some studies (23, 35) but less expressed in others (36). Zhang *et al* (34) concluded that the MLC surface markers from iPS are more closely related to iPS from hES than to adult bone marrow MSC. We found this similarity between MLC from iPS and hES in flow cytometry and in the differentiation analysis (data not shown).

To gain insight in the chondrogenic capacities of C-MLC, we tested their chondrogenic capacities in PCL and PLA scaffolds. Biomechanical assays demonstrate that selected pseudoclones of MLC showed increased biophysical properties, especially C-MLC2 in PCL scaffolds with and without functionalization. Mechanical properties of engineered cartilage can be correlate

with the ECM biochemical content, as the tensile strength is attributed to Col II and compressive properties to PG (40). PCL and PCLHA scaffolds present a high porosity structure, highly interconnected, so cells can colonize free areas allowing the diffusion of nutrients and gases (data not shown). PCLHA functionalized scaffolds present higher water content (31), and are more hydrophilic in chondrogenic media compared with PCL.

To our knowledge, until the moment there is no data comparing the usefulness of selecting specific cell populations derived from human iPS cells that further differentiate to hyaline cartilage in smart engineered scaffolds. Liu *et al* (38) have tested the chondrogenesis of murine cells from pseudoclonal derived cells from EBs. After seed them on PCL/gelatin scaffolds they showed a good chondrogenic capacity. PCL scaffolds modified with HA have been previously tested with adult human chondrocytes from an arthroplastic patient (31). Here we observe that PCLHA enhance better gene expression of chondrogenic genes like COL2, ACAN and HAPLN1 in all cell types tested than in PCL, confirming the chondrostimulatory action of HA. This data confirm again that functionalization of different scaffolds increase chondrogenic gene expression in iPS derived MLC. In addition, all bioconstructs analyzed showed highly Col II and CS in a complex and compact ECM surrounding the chondrocyte-like derive cells.

This impulse us to suggest that pseudoclonal derivation is a good tool for selection of the best chondroinducible cell sources. In addition, iPS technology and 3D-bioengineered scaffolds showed to be a promise attempt, reinforcing the concept that MLC are a good alternative cell source for treatment of cartilage illness.

## **5. Acknowledgements**

Senda Jiménez and Yvonne Richaud, laboratory technicians from IBEC.

Purificación Filgueira and Noa Gollanes, laboratory technicians from INIBIC-CHUAC. C. Sanjurjo-Rodríguez was beneficiary of fellowships from Fundación Profesor Novoa Santos, CIBER-BBN and Universidade da Coruña, Spain.

## **6. Author disclosure statement**

No competing financial interests exist.

## **7. References**

1. Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism* **50**2004.
2. Darling, E.M., and Athanasiou, K.A. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research* **23**, 425, 2005.
3. Claus, S., Mayer, N., Aubert-Foucher, E., Chajra, H., Perrier-Groult, E., Lafont, J., Piperno, M., Damour, O., and Mallein-Gerin, F. Cartilage-Characteristic Matrix Reconstruction by Sequential Addition of Soluble Factors During Expansion of Human Articular Chondrocytes and Their Cultivation in Collagen Sponges. *Tissue Engineering Part C-Methods* **18**, 104, 2012.
4. Chen, C.T., Burton-Wurster, N., Borden, C., Hueffer, K., Bloom, S.E., and Lust, G. Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* **19**, 703, 2001.
5. Hollander, A.P., Dickinson, S.C., and Kafienah, W. Stem Cells and Cartilage Development: Complexities of a Simple Tissue. *Stem Cells* **28**, 1992, 2010.

6. Kraus, V.B., Blanco, F.J., Englund, M., Karsdal, M.A., and Lohmander, L.S. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* 2015.
7. Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., and Noel, D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology* **27**, 307, 2009.
8. Buckwalter, J.A., and Mankin, H.J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instructional course lectures* **47**, 487, 1998.
9. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* **7**, 211, 2001.
10. Mahmoudifar, N., and Doran, P.M. Extent of Cell Differentiation and Capacity for Cartilage Synthesis in Human Adult Adipose-Derived Stem Cells: Comparison with Fetal Chondrocytes. *Biotechnology and Bioengineering* **107**, 393, 2010.
11. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143, 1999.
12. Wang, L., Tran, I., Seshareddy, K., Weiss, M.L., and Detamore, M.S. A Comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A* **15**, 2259, 2009.

13. Diaz-Prado, S., Muinos-Lopez, E., Hermida-Gomez, T., Cicione, C., Rendal-Vazquez, M.E., Fuentes-Boquete, I., de Toro, F.J., and Blanco, F.J. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation* **81**, 162, 2011.
14. Young, H.E., Steele, T.A., Bray, R.A., Hudson, J., Floyd, J.A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas, P.A., and Black, A.C. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anatomical Record* **264**, 51, 2001.
15. Fan, J., Varshney, R.R., Ren, L., Cai, D., and Wang, D.-A. Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration. *Tissue Engineering Part B-Reviews* **15**, 75, 2009.
16. Arufe, M.C., De la Fuente, A., Fuentes, I., de Toro, F.J., and Banco, F.J. Chondrogenic Potential of Subpopulations of Cells Expressing Mesenchymal Stem Cell Markers Derived From Human Synovial Membranes. *Journal of Cellular Biochemistry* **111**, 834, 2010.
17. Mimeault, M., and Batra, S.K. Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Research Reviews* **8**, 94, 2009.
18. Barberi, T., Willis, L.M., Socci, N.D., and Studer, L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *Plos Medicine* **2**, 554, 2005.



19. Toh, W.S., Lee, E.H., Guo, X.-M., Chan, J.K.Y., Yeow, C.H., Choo, A.B., andCao, T. Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells. *Biomaterials* **31**, 6968, 2010.
20. Oldershaw, R.A., Baxter, M.A., Lowe, E.T., Bates, N., Grady, L.M., Soncin, F., Brison, D.R., Hardingham, T.E., andKimber, S.J. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nature Biotechnology* **28**, 1221, 2010.
21. Medvedev, S.P., Grigor'eva, E.V., Shevchenko, A.I., Malakhova, A.A., Dementyeva, E.V., Shilov, A.A., Pokushalov, E.A., Zaidman, A.M., Aleksandrova, M.A., Plotnikov, E.Y., Sukhikh, G.T., andZakian, S.M. Human Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Fetal Neural Stem Cells Successfully Undergo Directed Differentiation into Cartilage. *Stem Cells and Development* **20**, 1099, 2011.
22. Kim, M.-J., Son, M.J., Son, M.-Y., Seol, B., Kim, J., Park, J., Kim, J.H., Kim, Y.-H., Park, S.A., Lee, C.-H., Lee, K.-S., Han, Y.-M., Chang, J.-S., andCho, Y.S. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells From Osteoarthritis Patient-Derived Synovial Cells. *Arthritis and Rheumatism* **63**, 3010, 2011.
23. Liu, Y., Goldberg, A.J., Dennis, J.E., Gronowicz, G.A., andKuhn, L.T. One-Step Derivation of Mesenchymal Stem Cell (MSC)-Like Cells from Human Pluripotent Stem Cells on a Fibrillar Collagen Coating. *Plos One* **7**2012.
24. Koyama, N., Miura, M., Nakao, K., Kondo, E., Fujii, T., Taura, D., Kanamoto, N., Sone, M., Yasoda, A., Arai, H., Bessho, K., andNakao, K. Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiated into Chondrogenic Lineage Via Generation of Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells and Development* **22**, 102, 2013.

25. Hwang, N.S., Varghese, S., Zhang, Z., andElisseeff, J. Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived cells in arginine-glycine-aspartate modified hydrogels. *Tissue Engineering* **12**, 2695, 2006.
26. Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., andYoo, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research* **238**, 265, 1998.
27. Cicione, C., Muinos-Lopez, E., Hermida-Gomez, T., Fuentes-Boquete, I., Diaz-Prado, S., andBlanco, F.J. Alternative protocols to induce chondrogenic differentiation: transforming growth factor-beta superfamily. *Cell and Tissue Banking* **16**, 195, 2015.
28. Huang, A.H., Farrell, M.J., andMauck, R.L. Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. *Journal of Biomechanics* **43**, 128, 2010.
29. Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boue, S., andIzpisua Belmonte, J.C. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology* **26**, 1276, 2008.
30. Lebourg, M., Suay Anton, J., andGomez Ribelles, J.L. Hybrid structure in PCL-HAp scaffold resulting from biomimetic apatite growth. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **21**, 33, 2010.
31. Lebourg, M., Rodenas Rochina, J., Sousa, T., Mano, J., andGomez Ribelles, J.L. Different hyaluronic acid morphology modulates primary articular chondrocyte behavior in hyaluronic acid-coated polycaprolactone scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **101**, 518, 2013.

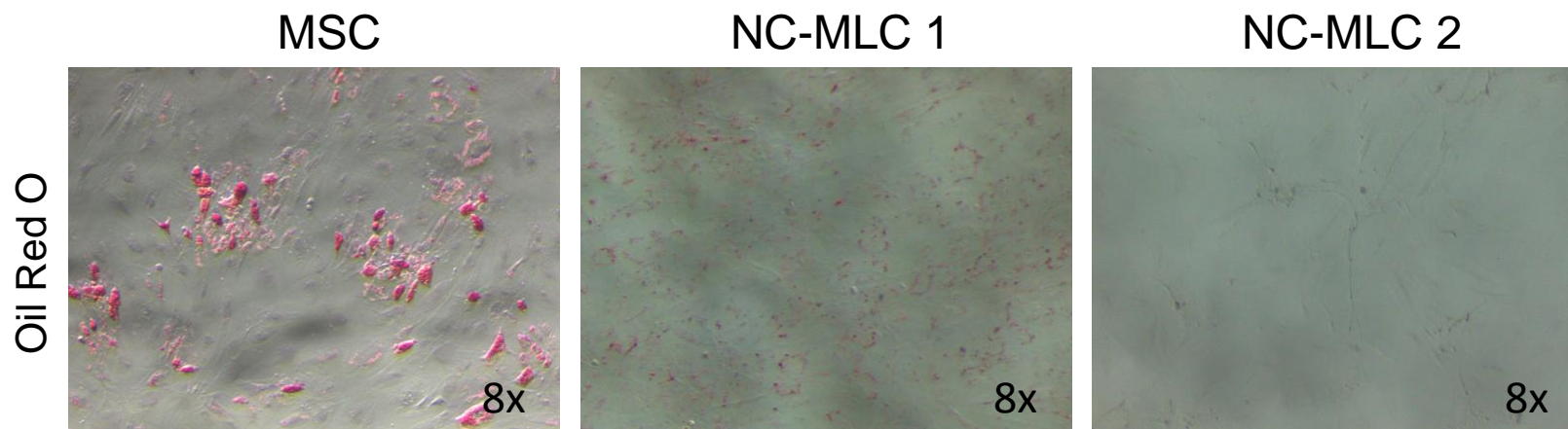
32. Navarro, M., Engel, E., Planell, J.A., Amaral, I., Barbosa, M., and Ginebra, M.P. Surface characterization and cell response of a PLA/CaP glass biodegradable composite material. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **85A**, 477, 2008.
33. Brown, S.E., Tong, W., and Krebsbach, P.H. The Derivation of Mesenchymal Stem Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Cells Tissues Organs* **189**, 256, 2009.
34. Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H.-F., Stewart, C.L., and Colman, A. A Human iPSC Model of Hutchinson Gilford Progeria Reveals Vascular Smooth Muscle and Mesenchymal Stem Cell Defects. *Cell Stem Cell* **8**, 31, 2011.
35. Villa-Diaz, L.G., Brown, S.E., Liu, Y., Ross, A.M., Lahann, J., Parent, J.M., and Krebsbach, P.H. Derivation of Mesenchymal Stem Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells Cultured on Synthetic Substrates. *Stem Cells* **30**, 1174, 2012.
36. Frobel, J., Hemeda, H., Lenz, M., Abagnale, G., Joussen, S., Denecke, B., Saric, T., Zenke, M., and Wagner, W. Epigenetic Rejuvenation of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **3**, 414, 2014.
37. Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.-X., Eckstein, V., Boukamp, P., and Ho, A.D. Aging and Replicative Senescence Have Related Effects on Human Stem and Progenitor Cells. *Plos One* **4**2009.
38. Liu, J., Nie, H., Xu, Z., Niu, X., Guo, S., Yin, J., Guo, F., Li, G., Wang, Y., and Zhang, C. The Effect of 3D Nanofibrous Scaffolds on the Chondrogenesis of

Induced Pluripotent Stem Cells and Their Application in Restoration of Cartilage Defects. Plos One **9**2014.

39. Guzzo, R.M., Gibson, J., Xu, R.-H., Lee, F.Y., and Drissi, H. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. Journal of Cellular Biochemistry **114**, 480, 2013.

40. Kelly, D.J., Crawford, A., Dickinson, S.C., Sims, T.J., Mundy, J., Hollander, A.P., Prendergast, P.J., and Hatton, P.V. Biochemical markers of the mechanical quality of engineered hyaline cartilage. Journal of Materials Science-Materials in Medicine **18**, 273, 2007.

A



B

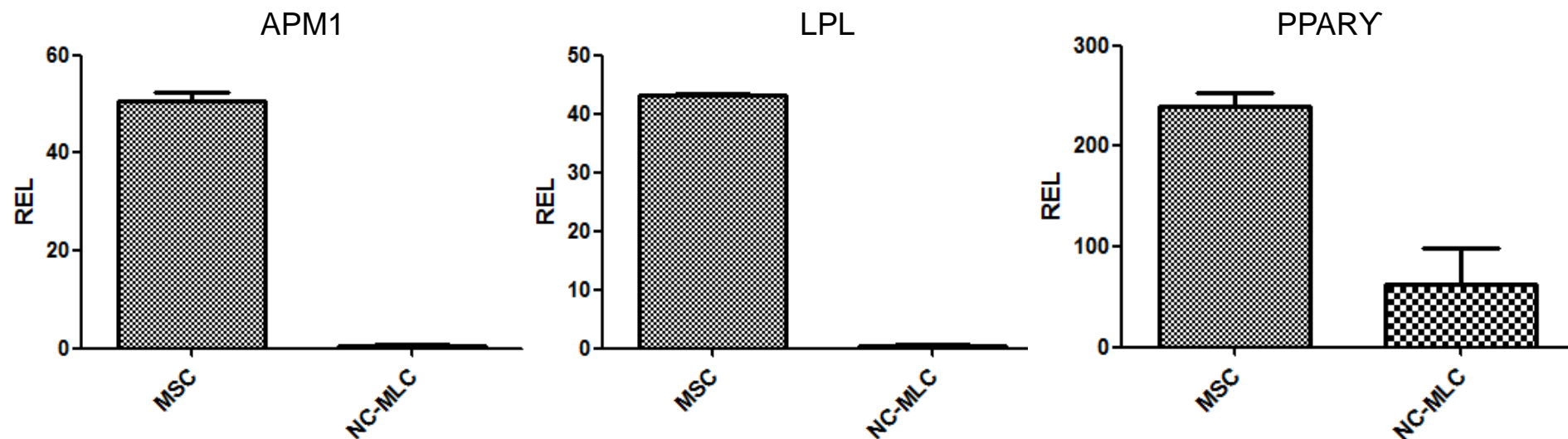
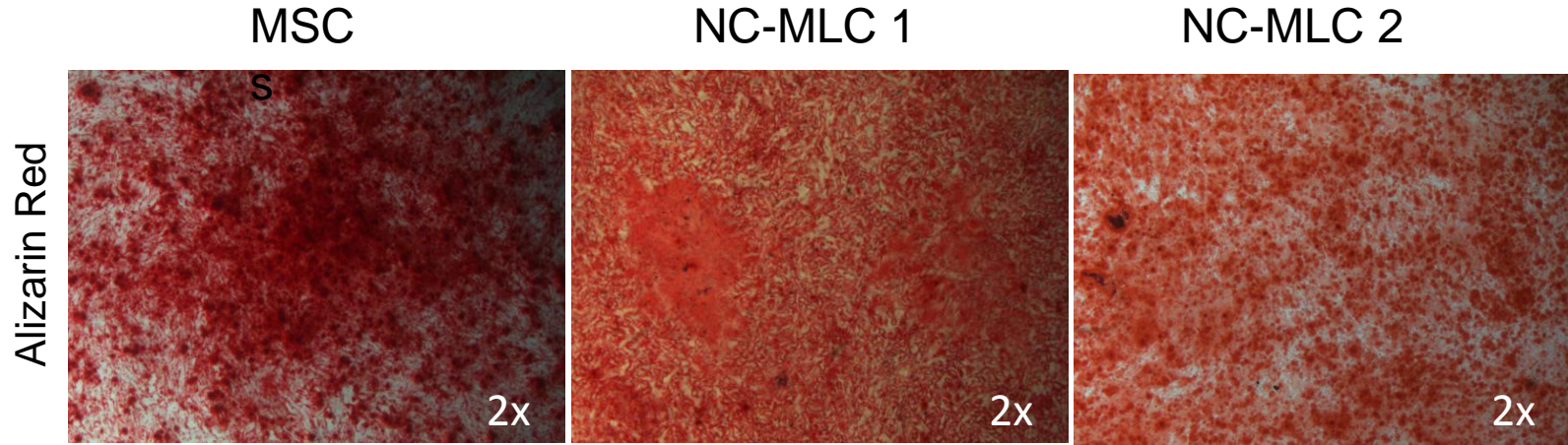


Figure 1: Adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) and non-clonal-MSC like cells (NC-MLC). A) Images from Oil Red O staining for typical adipogenic lipid droplets. B) Analysis of relative expression levels (REL) for adipogenic genes: Adiponectin (APM1), Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARY), Lipoprotein lipase (LPL).

A



B

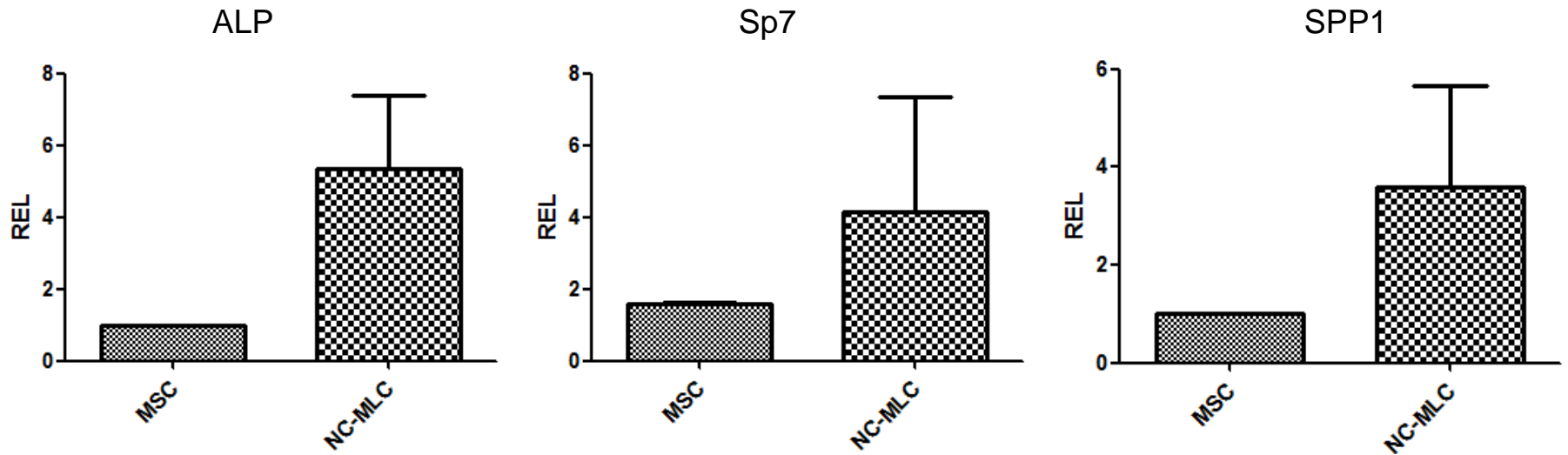


Figure 2: Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) and non-clonal-MSC like cells (NC-MLC). A) Images from Alizarin Red staining for typical calcium phosphate deposits. B) Analysis of relative expression levels (REL) for osteogenic genes: Alkaline phosphatase (ALP), Osterix (Sp7), Osteopontin (SPP1).



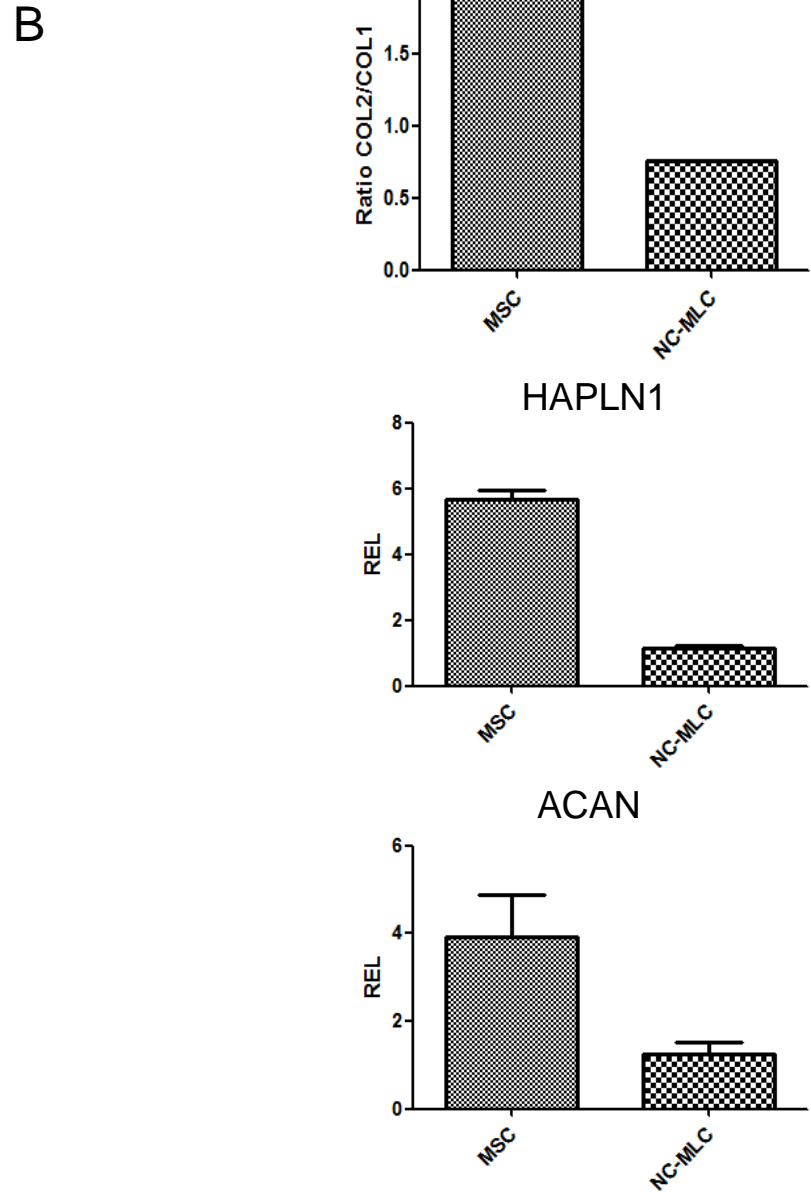
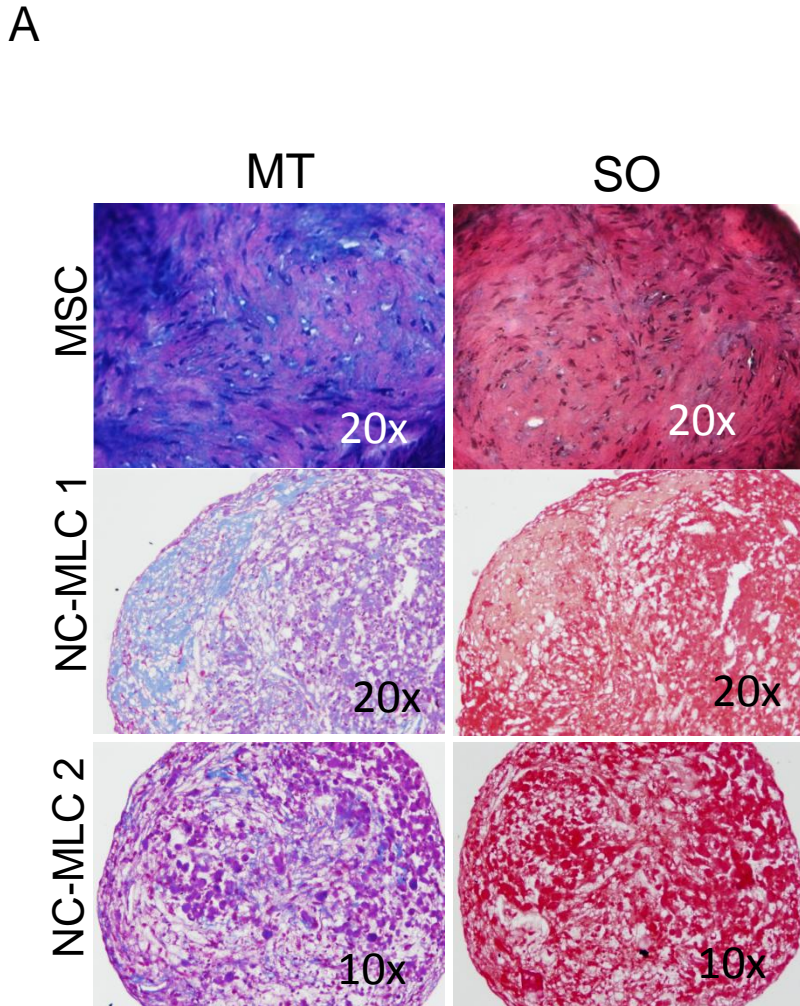


Figure 3: Chondrogenic differentiation in micromass cell pellets of mesenchymal stem cells (MSC) and non-clonal-MSC like cells (NC-MLC). A) Images from Masson's thrichomic (MT) and Safranin O (SO) staining for collagen and proteoglycans. B) Analysis of relative expression levels (REL) for chondrogenic genes: ratio of Type II and type I collagen (COL2/COL1), Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1), and Aggrecan (ACAN).

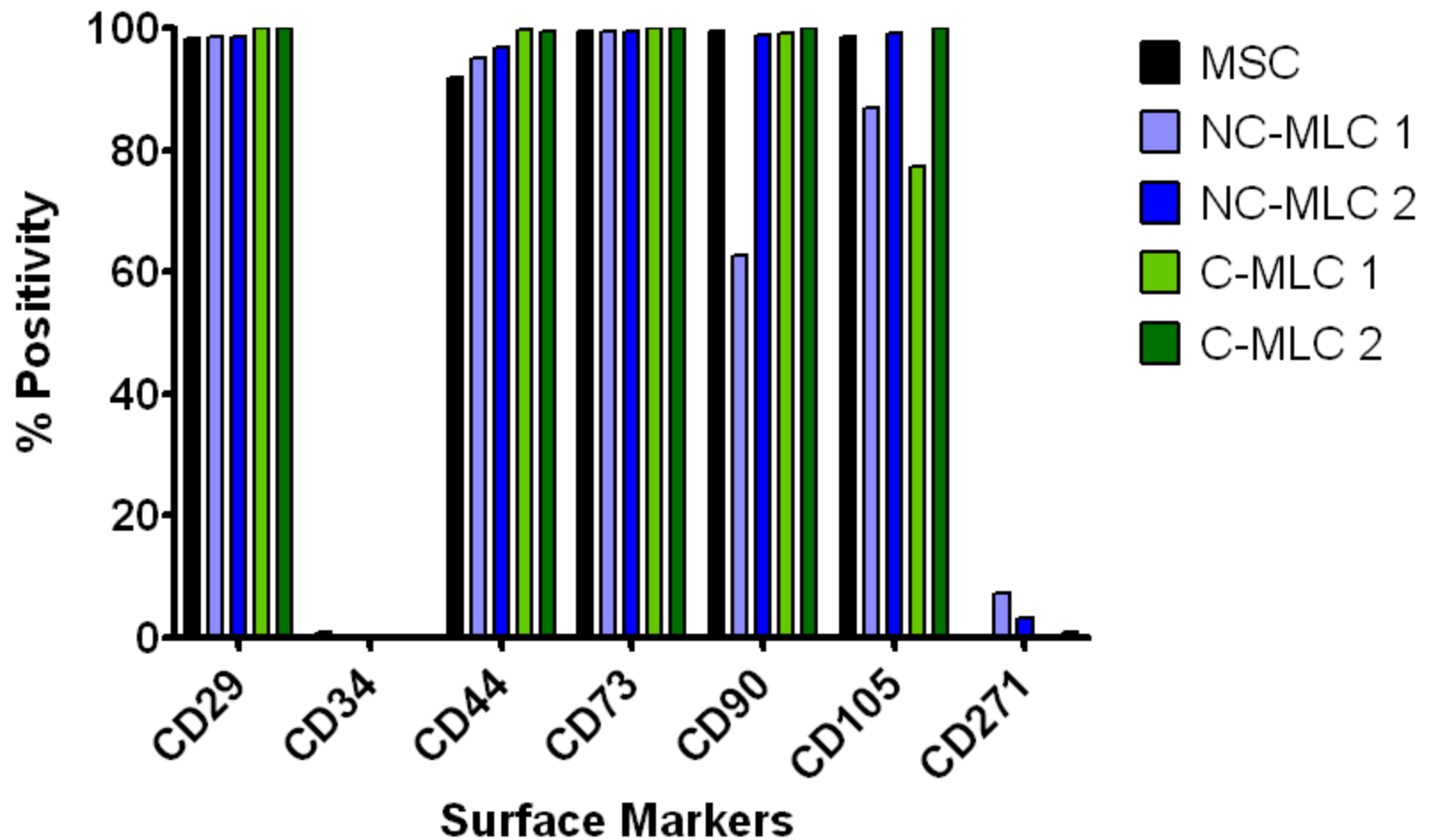
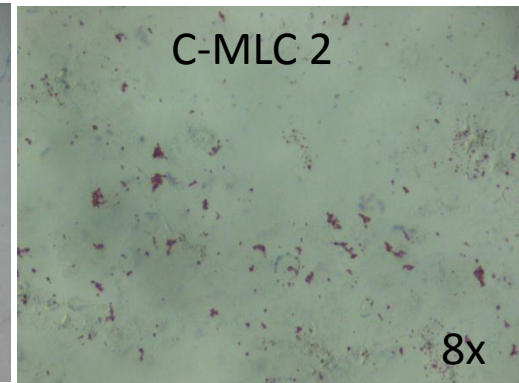
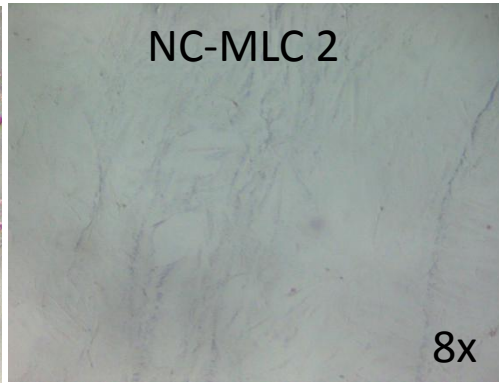
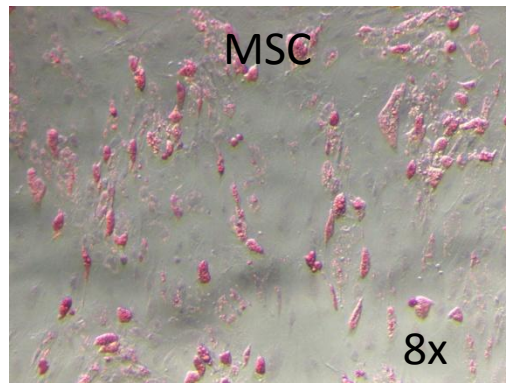
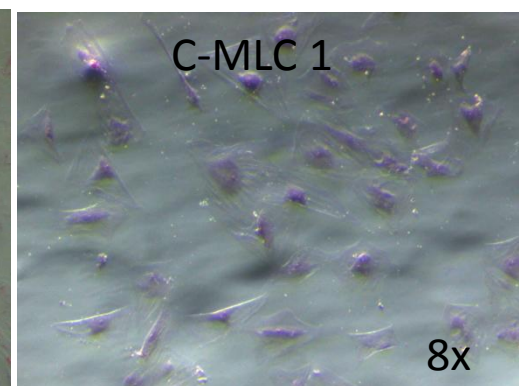
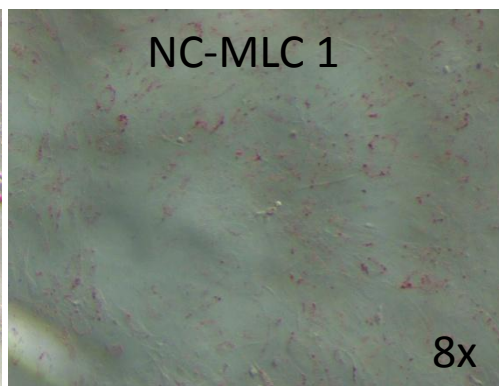
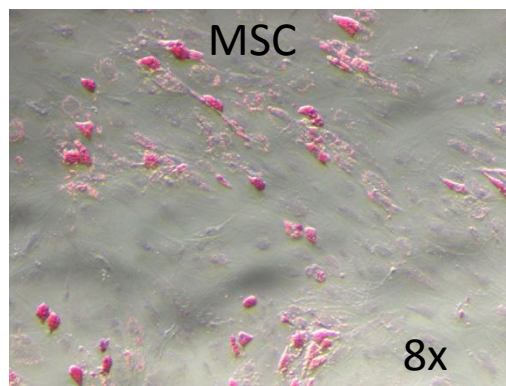


Figure 4: Percentage of positivity (%) for the expression of typical mesenchymal stem cell (MSC) cell surface markers. NC-MLC: non-clonal MSC like-cells; C-MLC: pseudoclonal MSC like cells.



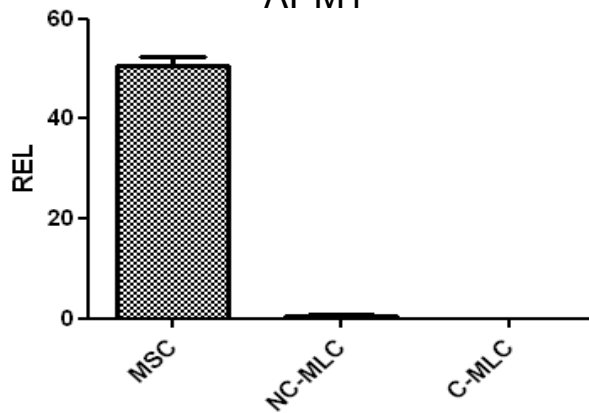
A

Oil Red O

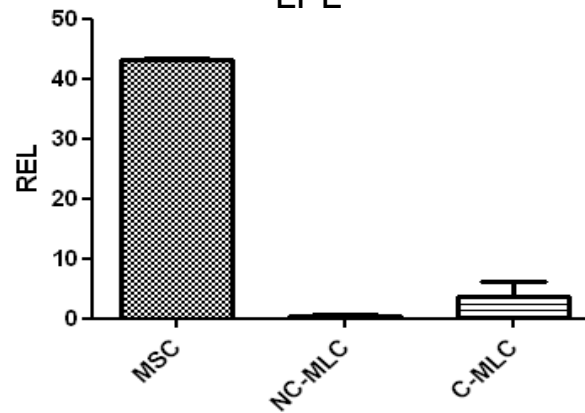


B

APM1



LPL



PPARY

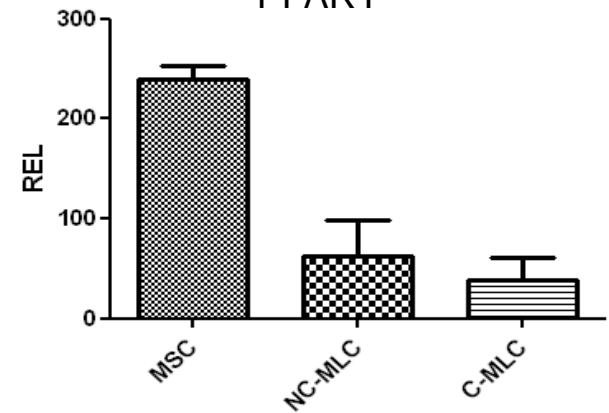


Figure 5: Adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC), non-clonal MSC like cells (NC-MLC) and pseudoclonal MSC like cells (C-MLC). A) Images from Oil Red O staining for typical adipogenic lipid droplets. B) Analysis of relative expression levels (REL) for adipogenic genes: Adiponectin (APM1), Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARY), Lipoprotein lipase (LPL).

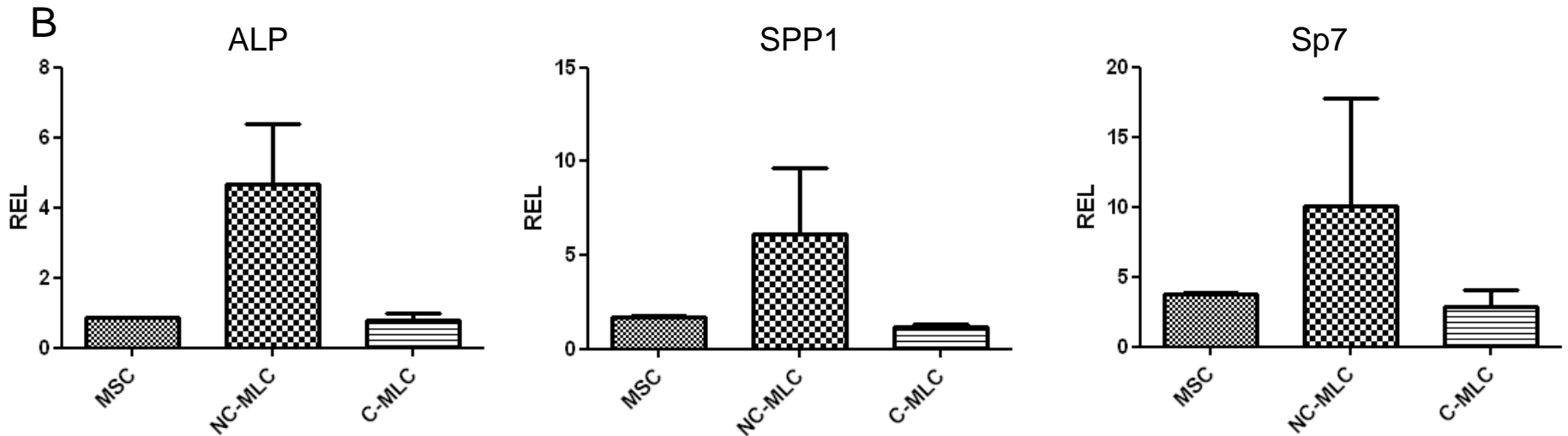
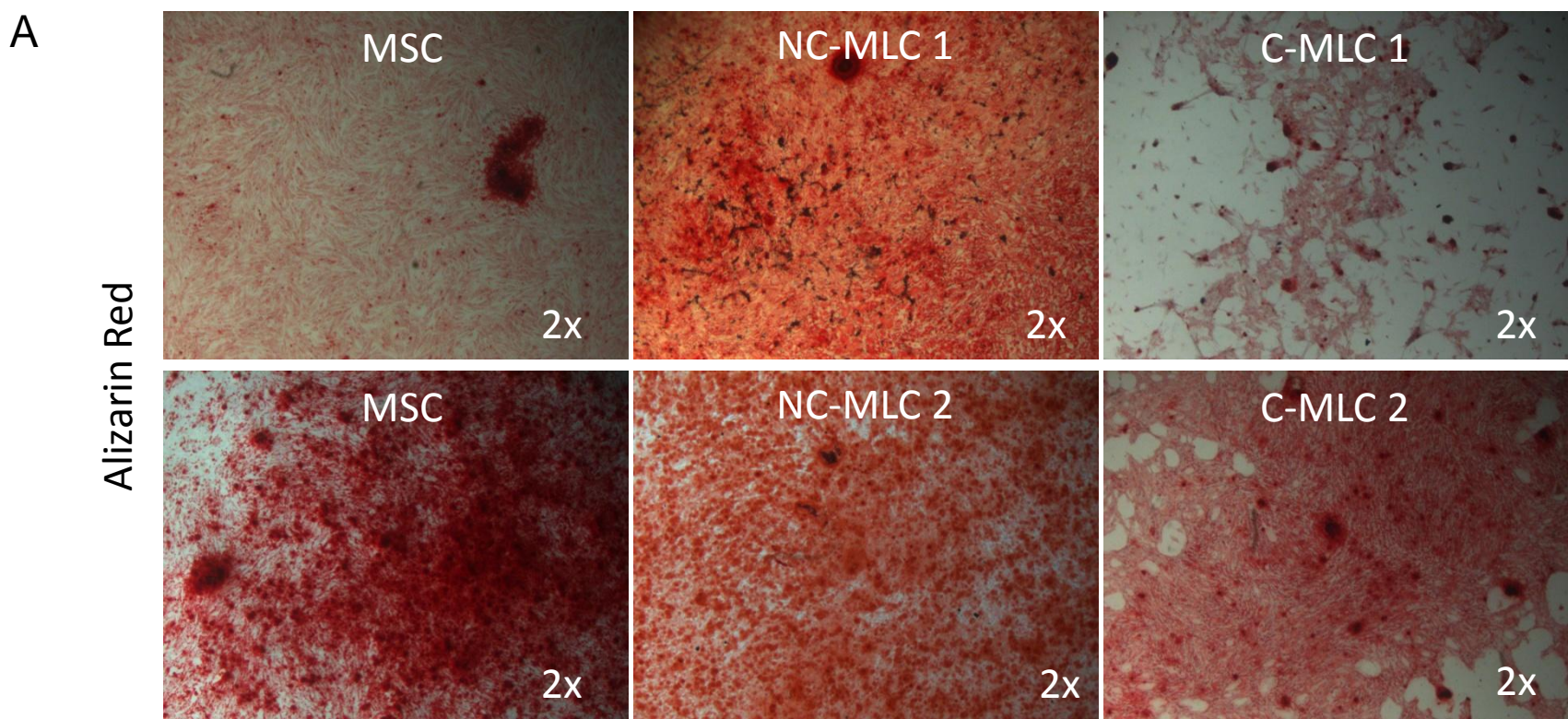


Figure 6: Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC), non-clonal MSC like cells (NC-MLC) and pseudoclonal MSC like cells (C-MLC). A) Images from Alizarin Red staining for typical calcium phosphate deposits. B) Analysis of relative expression levels (REL) for osteogenic genes: Alkaline phosphatase (ALP), Osterix (Sp7), Osteopontin (SPP1).



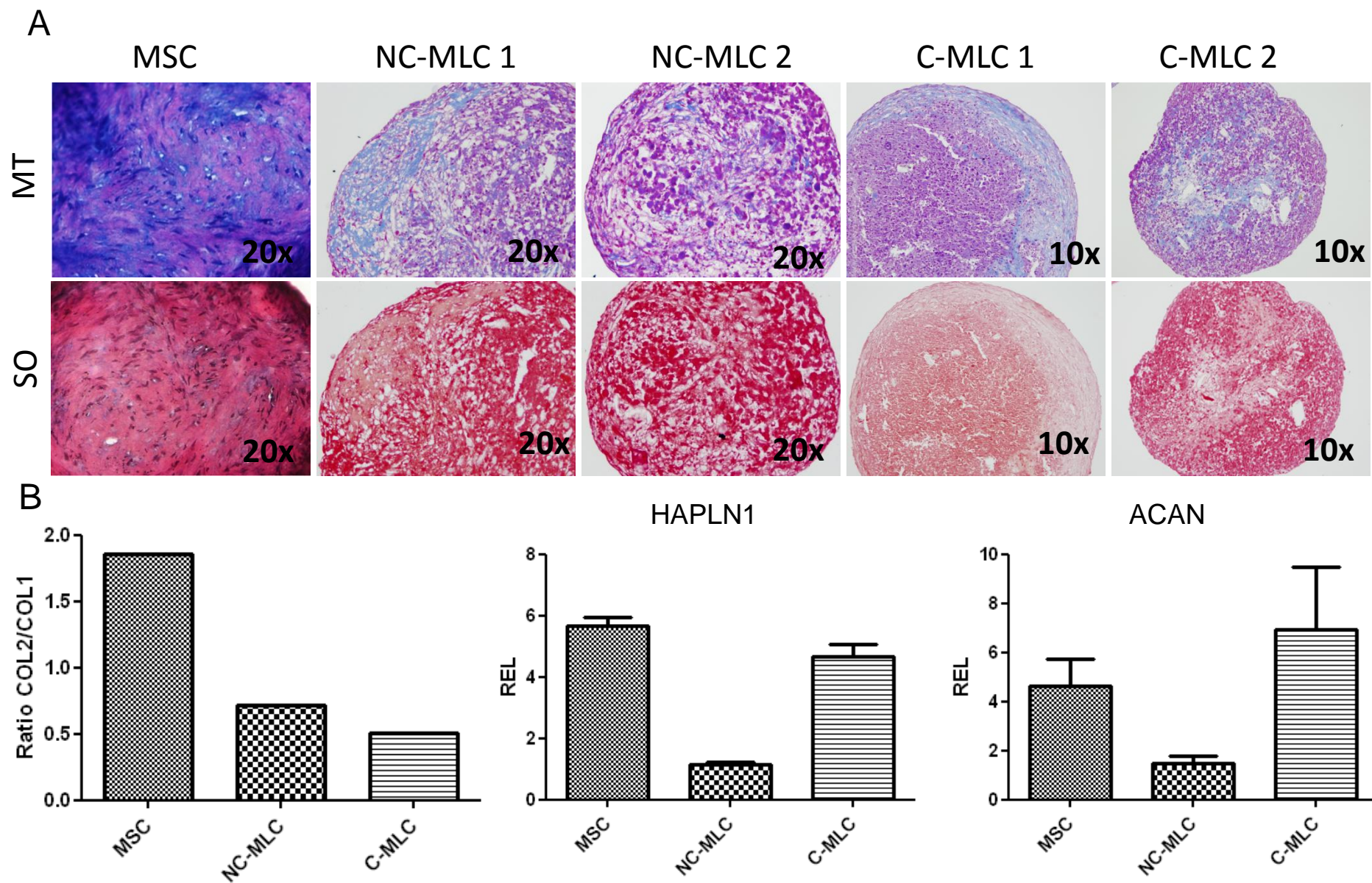


Figure 7: Chondrogenic differentiation in micromass cell pellets of mesenchymal stem cells (MSC), non-clonal MSC like cells (NC-MLC) and pseudoclonal MSC like cells (C-MLC). A) Images from Masson's thrichomic (MT) and Safranin O (SO) staining for collagen and proteoglycans. B) Analysis of relative expression levels (REL) for chondrogenic genes: ratio of Type II and type I collagen (COL2/COL1), Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1), and Aggrecan (ACAN).

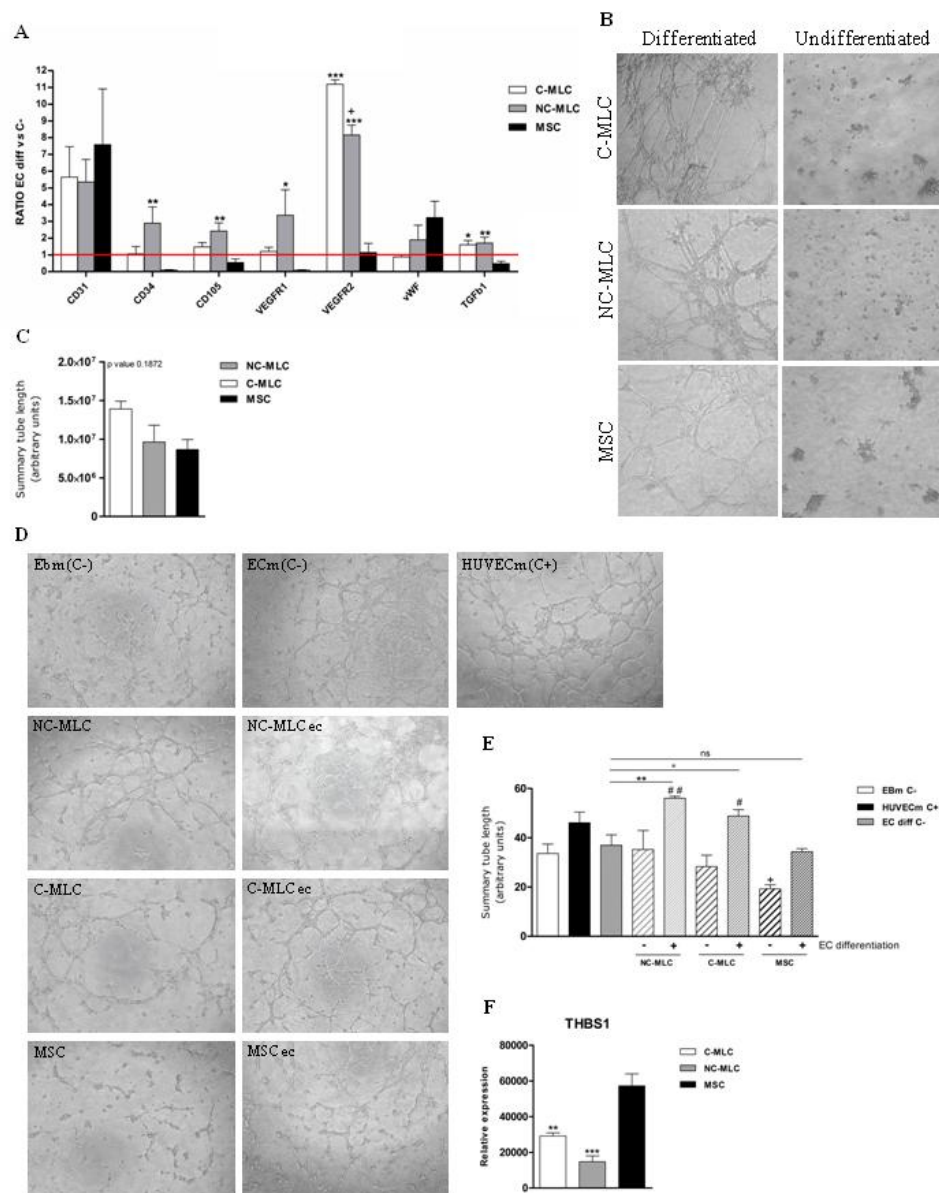


Figure 8. Endothelial cell differentiation (A-C) and HUVEC angiotube formation assay (D-F). A) Expression of endothelial markers B) Images of capillary-like network formation C) Quantification of total length of the formed tubes D) Images from HUVECs tube formation assay E) Summary of HUVECs tube length in different conditioned mediums F) Relative expression levels of antiangiogenic molecule THBS1.

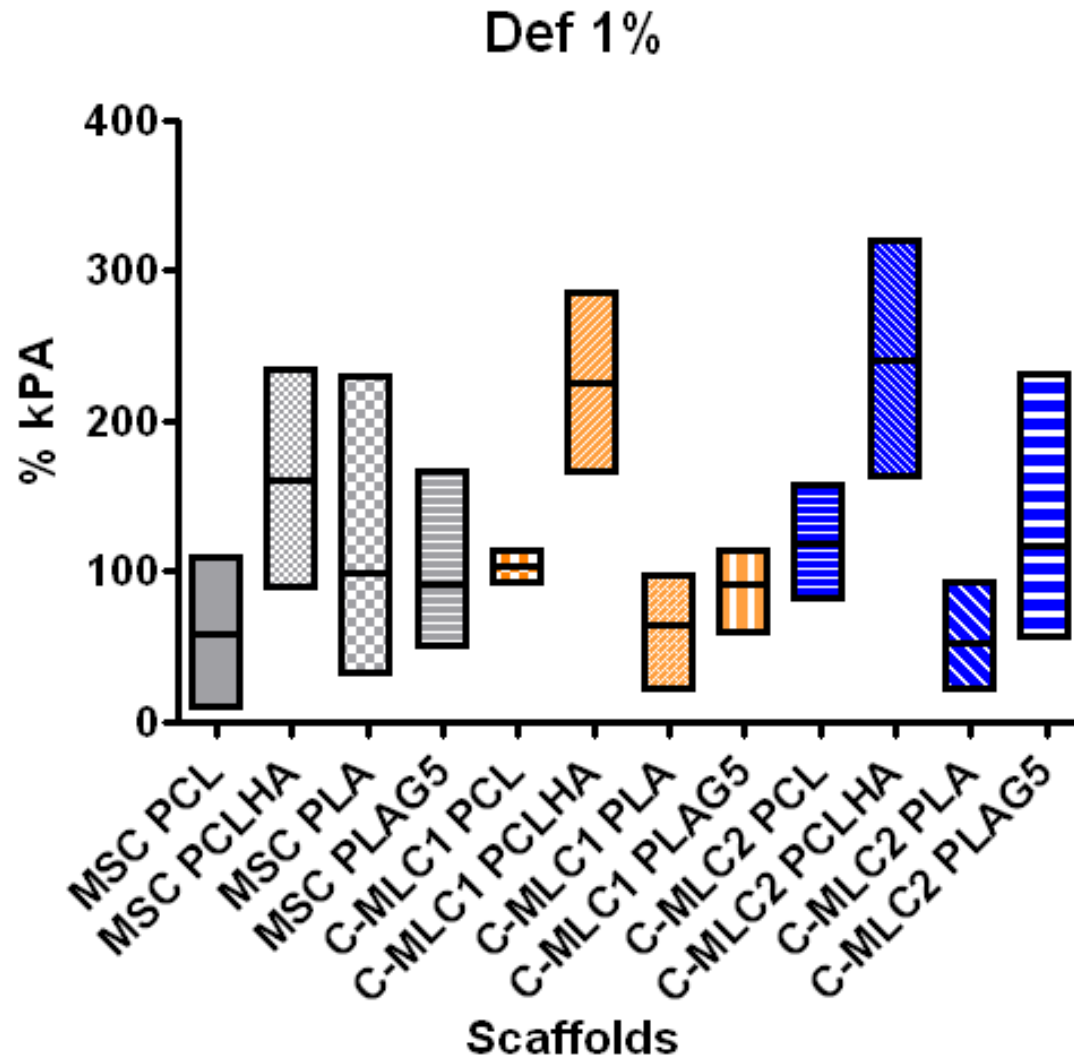
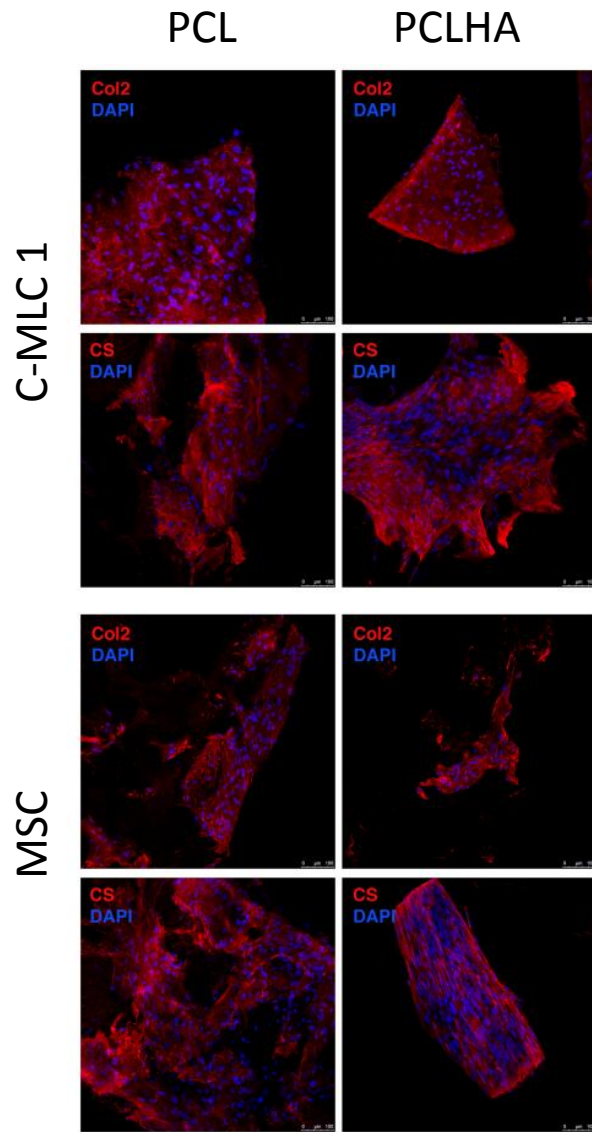


Figure 9: Percentage of force (%kPa) applied to deform 1%. MSC: mesenchymal stem cells; C-MLC: pseudoclonal MSC like cells. PCL: polycaprolactone; PCLHA: hyaluronic acid PCL; PLA: polylactic acid; PLAG5: PLA (poly (95L/5DL)-phosphate glass particles).

A



B

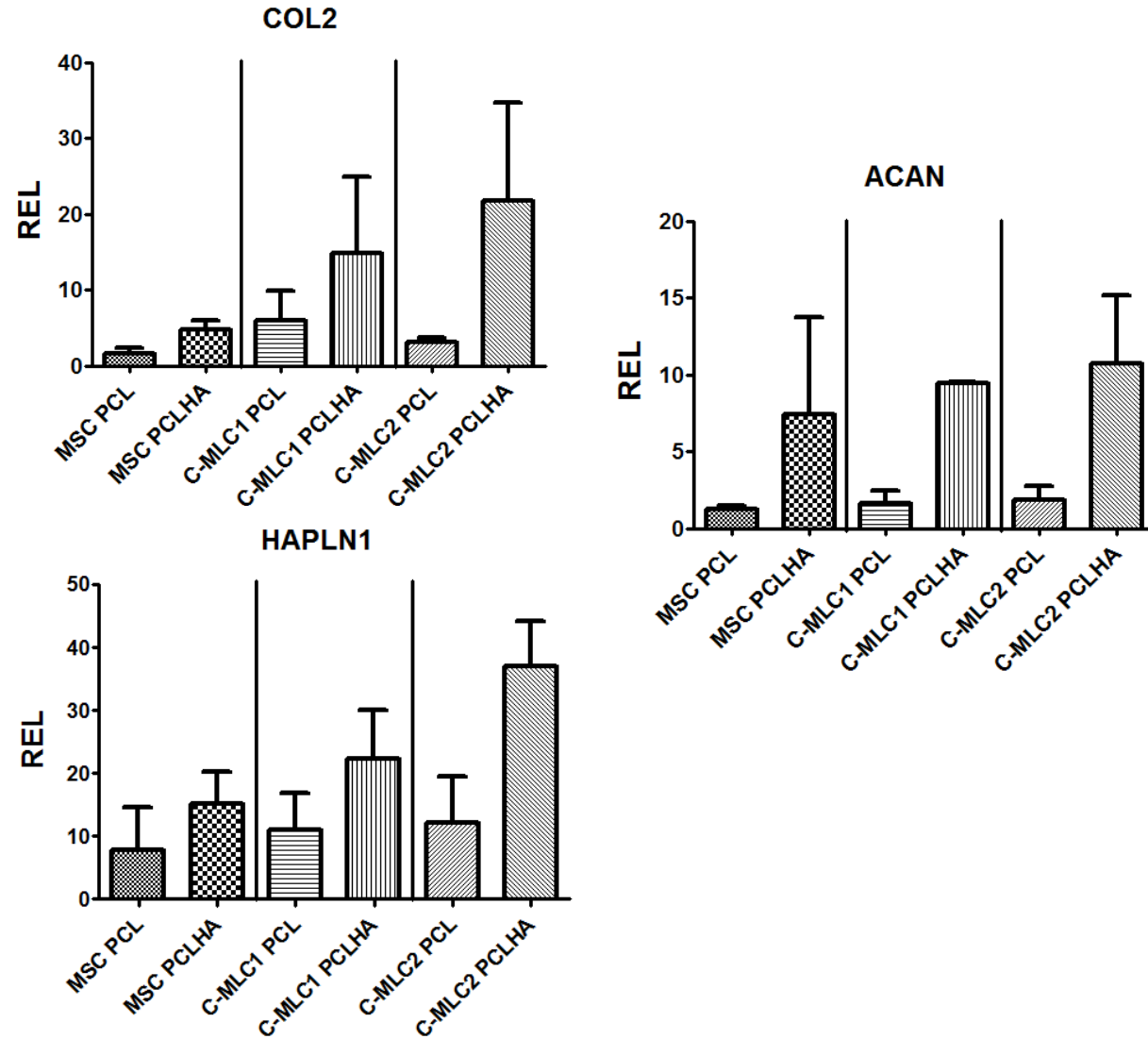


Figure 10: Chondrogenic differentiation in polycaprolactone (PCL) scaffolds of mesenchymal stem cells (MSC) and pseudoclonal MSC like cells (C-MLC). A) Images from collagen type II (Col2) and chondroitin sulfate (CS) immunostaining. B) Analysis of relative expression levels (REL) for chondrogenic genes: Type II collagen (COL2), Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1), and Aggrecan (ACAN).



	Analysis	Fluorochrome	Dilution	Manufacturer
Anti-human CD29	Flow cytometry	PE	1:50	BD-Bioscience
Anti-human CD44	Flow cytometry	FITC	1:50	Biolegend
Anti-human CD73	Flow cytometry	PE	1:50	Biolegend
Anti-human CD90	Flow cytometry	PE	1:50	Biolegend
Anti-human CD105	Flow cytometry	APC	1:20	Biolegend
Anti-human CD271	Flow cytometry	FITC	1:20	?
Anti-human CD34	Flow cytometry	PE	1:10	?

Supplementary Figure 1. Fluorochrome-conjugated antibodies used in flow cytometry. PE (phycoerythrin), FITC (Fluorescein isothiocyanate), APC (Allophycocyanin).

Type	Name	F	R
<b>C</b>	COL I	GTGATGCTGGTCCTGTTGGT	CACCATCGTGAGCCTTCTCT
	COL II	GTGTCAGGGCCAGGATGT	TCCCAGTGTCACAGACACAGAT
	ACAN	AGACTCACACAGTCGAAACAGCCA	TCCTGGTCTGCAGCAGTTGATTCT
	HAPLN	AGTGTTTCTGAAGGGAGGCAGTGA	ACCACACCTTGTAAGTCCAGTGCT
<b>A</b>	LPL	ATGGCTGGACGGTAACAGGAATGT	ATCCTGTCCCACCAGTTTGGTGTA
	PPAR $\gamma$	GGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGT	AGGGCTTGTAGCAGGTTGTCTTGA
	APM1	GGTGAGAAAGGAGATCCAGGT	TGCTGAGCGGTATACATAGGC
<b>O</b>	SP7	GCTTGAGGAGGAAGTTCACATATGGCT	GTACGGCTTCTTTGTGCCTGCTTT
	OP	CGCAGACCTGACATCCAGT	GGCTGTCCCAATCAGAAGG
	ALP	GACGGACCCGTCACTCTC	GTGCCCCGTGGTCAATTCT
<b>*</b>	GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	AGGGATCTCGCTCCTGGAA

Supplementary Figure 2: Primers used in qRT-PCR. Type I collagen (COL1), type II collagen (COL2), Aggrecan, (ACAN), Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN), Lipoprotein lipase (LPL), Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), Adiponectin (APM1), Osterix (SP7), Osteopontin (SPP1), Alkaline phosphatase (ALP), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). C: Chondrogenic; Ad: Adipogenic; O: Osteogenic; \*Housekeeping.



Gene symbol	Taq Man gene expression assays reference
<i>CD34</i>	<i>Hs02576480_m1</i>
<i>ENG</i>	<i>Hs00923996_m1</i>
<i>FLT1</i>	<i>Hs01052937_m1</i>
<i>KDR</i>	<i>Hs00911703_m1</i>
<i>PECAM1</i>	<i>Hs00169777_m1</i>
<i>TGFb1</i>	<i>Hs00998133_m1</i>
<i>TSP1</i>	<i>Hs00962908_m1</i>
<i>VWF</i>	<i>Hs00169795_m1</i>
<i>GAPDH</i>	<i>4326317E</i>

Supplementary Figure 3. List of TaqMan gene expression assays for real time PCR



# Collagen-Containing Scaffolds Enhance Attachment and Proliferation of Non-Cultured Bone Marrow Multipotential Stromal Cells

Jehan J. El-Jawhari,<sup>1,2</sup> Clara Sanjurjo-Rodríguez,<sup>1</sup> Elena Jones,<sup>1,2</sup> Peter V. Giannoudis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Academic Unit of Musculoskeletal Disease, Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine, St. James University Hospital, University of Leeds, LS9 7TF, Leeds, United Kingdom, <sup>2</sup>NIHR, Leeds Biomedical Research Unit, Chapel Allerton Hospital, University of Leeds, LS7 4SA, Leeds, United Kingdom

Received 17 May 2015; accepted 12 October 2015

Published online 1 December 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.23070

**ABSTRACT:** Large bone defects are ideally treated with autografts, which have many limitations. Therefore, osteoconductive scaffolds loaded with autologous bone marrow (BM) aspirate are increasingly used as alternatives. The purpose of this study was to compare the growth of multipotential stromal cells (MSCs) from unprocessed BM on a collagen-containing bovine bone scaffold (Orthoss<sup>®</sup> Collagen) with a non-collagen-containing bovine bone scaffold, Orthoss<sup>®</sup>. Another collagen-containing synthetic scaffold, Vitoss<sup>®</sup> was included in the comparison. Colonization of scaffolds by BM MSCs ( $n = 23$  donors) was evaluated using microscopy, colony forming unit-fibroblast assay and flow-cytometry. The number of BM MSCs initially attached to Orthoss<sup>®</sup> Collagen and Vitoss<sup>®</sup> was similar but greater than Orthoss<sup>®</sup> ( $p = 0.001$  and  $p = 0.041$ , respectively). Furthermore, the number of MSCs released from Orthoss<sup>®</sup> Collagen and Vitoss<sup>®</sup> after 2-week culture was also higher compared to Orthoss<sup>®</sup> ( $p = 0.010$  and  $p = 0.023$ , respectively). Interestingly, collagen-containing scaffolds accommodated larger numbers of lymphocytic and myelomonocytic cells. Additionally, the proliferation of culture-expanded MSCs on Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> was greater compared to Orthoss<sup>®</sup> ( $p = 0.047$  and  $p = 0.004$ , respectively). Collectively, collagen-containing scaffolds were superior in supporting the attachment and proliferation of MSCs when they were loaded with unprocessed BM aspirates. This highlights the benefit of collagen incorporation into bone scaffolds for use with autologous bone marrow aspirates as autograft substitutes. © 2015 The Authors. *Journal of Orthopaedic Research* Published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of Orthopaedic Research Society. *J Orthop Res* 34:597–606, 2016.

**Keywords:** multipotential stromal cells (MSCs); bone marrow (BM); collagen; scaffolds; bone graft substitutes

Non-union or delayed bone healing is still a problem in a considerable number of injuries associated with fractures and/or bone loss.<sup>1</sup> The gold standard therapy for fracture non-union remains the implantation of bone autograft.<sup>2</sup> However, its use is associated with problems including limited accessibility, formation of haematoma, bleeding, infection, and harvest-related pain.<sup>3,4</sup> The use of autograft substitutes, such as allograft scaffolds provides a valid alternative, particularly when these scaffolds are loaded with autologous bone marrow (BM) aspirates, growth factors or their combination.<sup>5,6</sup> Autologous BM aspirates contain osteogenic progenitors, multipotential stromal cells (MSCs), which are crucial players in the process of bone repair.<sup>7,8</sup> MSC-loaded scaffolds have shown effectiveness in the experimental animal models of bone defects<sup>9–11</sup> and consequently have become a promising therapeutic method in the discipline of orthopaedic surgery.<sup>11,12</sup>

To enhance the repair of complicated bone fractures, there are many types of osteoconductive scaffolds

composed of either natural hydroxyapatite or synthetic materials, available for clinical use. The synthetic scaffolds are formed of inorganic calcium phosphate, polymers or composites of these materials.<sup>5,13</sup> Extracellular matrix (ECM) is formed of various proteins including collagen types I and II, fibronectin, biglycan, decorin, perlecan, and laminin. These components form the niche for BM MSCs in vivo and provide the mechanical and biological support for MSCs in order to respond to the surrounding signals favoring bone formation.<sup>14</sup> As a major component of ECM, collagen is used as a natural biocompatible polymer for bone substitution but it has poor mechanical properties. Thus, collagen is usually combined with other bone substitute materials.<sup>5,15</sup>

Studies analysing the biology of MSCs loaded on scaffolds particularly collagen-containing ones have been most commonly performed using culture-expanded MSCs.<sup>16,17</sup> Bone scaffolds are commonly soaked in unprocessed BM aspirates intra-operatively prior to use for treatment of non-union. However, little is known about how efficient is BM MSC attachment to scaffolds and how the modification of scaffold composition, such as collagen incorporation could affect colonization of these scaffolds by MSCs.

The aim of this study was to investigate the impact of collagen addition to a bovine bone allograft scaffold, on the attachment and proliferation of non-cultured MSCs, i.e., derived from unprocessed BM aspirates. A bovine bone scaffold, Orthoss<sup>®</sup> (non-collagen containing) was used as a control for the collagen-containing one, Orthoss<sup>®</sup> collagen. Another collagen-containing synthetic bone scaffold, Vitoss<sup>®</sup>, was also included in

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Grant sponsor: NIHR-Leeds Musculoskeletal Biomedical Research Unit (LMBRU); Grant sponsor: Geistlich Pharma; Grant sponsor: Fundación Profesor Novoa Santos (INIBIC-CHUAC, Spain); Grant sponsor: University of A Coruna.

Correspondence to: Peter V. Giannoudis (T: +44 113 3922750; F: +44 113 3922611; E-mail: pgiannoudi@aol.com)

© 2015 The Authors. *Journal of Orthopaedic Research* Published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of Orthopaedic Research Society

the study. Using unprocessed BM aspirates, we aimed to quantify rare MSCs, which were able to attach, survive and proliferate on these scaffolds.

## MATERIALS AND METHODS

### Scaffolds

The scaffolds used in this study were: Orthoss<sup>®</sup>, Orthoss<sup>®</sup> Collagen (Geistlich Surgery, Wolhusen, Switzerland) and Vitoss<sup>®</sup> (Stryker, Malvern, PA). Orthoss<sup>®</sup> is a bovine bone mineral, i.e., hydroxyapatite with nano pores (10–20 nm) and macro pores (100–300 µm). Orthoss<sup>®</sup> Collagen is a similar material as Orthoss<sup>®</sup> but is complemented with 10% porcine collagen. Vitoss<sup>®</sup> is a synthetic beta-tricalcium phosphate with pores of variable size (1–1,000 µm) and is supplemented with type I bovine collagen. Orthoss<sup>®</sup> was provided as 2–4 mm granules of total 7 g and with an average volume of 8 mm<sup>3</sup> per granule. The whole Orthoss<sup>®</sup> Collagen scaffold block (500 mg, 10 × 10 × 8 mm, 0.8 cc), was divided into eight equal pieces each of ~100 mm<sup>3</sup> volume. Vitoss<sup>®</sup> strip (25 × 100 × 4 mm, 10 cc) was punched using 4 mm sterile disposable biopsy punch with plunger (Miltex, NJ) into 50 mm<sup>3</sup> particles. To standardize the volume of all scaffolds (100 mm<sup>3</sup>); 12 granules of Orthoss, one piece of Orthoss<sup>®</sup> Collagen and two particles of Vitoss<sup>®</sup> were used for each experiment.

### Patients and Bone Marrow Samples

Following ethic committee approval (06/Q1206/127, National Research Ethics Committee Yorkshire & Humber–Leeds East), BM aspirates were obtained from the iliac crest of twenty three consented patients; 13 males and 10 females with median age of 47 years, range 14–82. All patients were undertaking elective orthopaedic surgery for various reasons but reported as having no underlying diseases. Ten millilitre of BM was aspirated using bevel tipped trocar needle (Stryker 306–111, 11-gauge, MI) and a single draw method and then placed in two EDTA containing VACUETTE<sup>®</sup> blood collection tubes. In some experiments, culture-expanded MSCs from seven donors were used. Culture-expanded MSCs were generated as previously described<sup>18</sup> and grown in Stem MACS MSC Expansion media (Miltenyi Biotec, Surrey, UK) supplemented with penicillin/streptomycin (Sigma–Aldrich, St. Louis) at 37°C/5% CO<sub>2</sub> culture condition.

### Loading Scaffolds With Bone Marrow Aspirates or Culture-Expanded MSCs

BM aspirates were thoroughly mixed then 500 µl of the aspirate was incubated with 100 mm<sup>3</sup> of each of three scaffolds. The same BM sample was used to load the three scaffolds in each experiment. Several replicates were performed depending on the type of experiment. The scaffolds were incubated with BM aspirate for one and half or three hours at 37°C with gentle rotational movement using a rotator with reciprocal turning angle, 45° and vibration angle, 5° (Biosan, Riga, Latvia), as described previously.<sup>19</sup> In some experiments, scaffolds were similarly incubated with passage three culture-expanded MSCs (average of 2 × 10<sup>5</sup> MSCs in 500 µl of media/100 mm<sup>3</sup> of each scaffold). Following incubation, scaffolds were gently rinsed in phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen, Paisley, UK) and then cultured in Stem MACS media. The culture media was half changed every 2–3 days to take the advantage of MSC autocrine activation of their proliferation.<sup>20</sup>

### Colony Forming Unit-Fibroblast Assay

The number of MSCs initially attached to scaffolds was detected using Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) assay to enumerate of the number of MSCs in BM aspirates before and after loading on scaffolds. To assess MSC numbers in BM aspirate before loading on scaffolds (pre-loading control), 200 µl of BM aspirate was added to 15 ml of Stem MACS media and then seeded in duplicate in 10 cm diameter culture dishes (Corning Life Sciences, Amsterdam, Holland). The media were replaced 48 h later to remove non-adherent cells and the culture was continued for 14 days.<sup>18</sup> The resulting colonies were counted after staining with methylene blue. The assay was repeated on the BM aspirates left at the end of incubation with the scaffolds (post-loading control). The numbers of MSCs attached to scaffolds were calculated using pre and post loading controls. As scaffolds are known to be different in their porosity and hence the amount of liquid that can be absorbed inside,<sup>21</sup> the volume of non-bound BM sample was recorded and used in the subsequent calculations of attached MSCs.

### Environmental Scanning Electron Microscopy

Scaffolds loaded with BM aspirates were processed for Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) to examine cell attachment on the surface of scaffolds after 2-week cultivation, as previously described.<sup>19</sup> Briefly, scaffolds were removed from the culture, washed twice with PBS and then fixed in 10% formalin. Empty scaffolds were similarly cultured and processed as negative controls. ESEM was performed using S-3700N scanning electron microscope (Hitachi, Berkshire, UK). Images were captured of hydrated samples under low vacuum and variable pressure at –20°C.

### Histology

Histology was used to assess the presence of attached MSCs on the surface and inside scaffolds after 2-weeks of culture. After harvesting from culture, scaffolds were gently washed with PBS and subsequently, kept in 10% formalin for cell fixation for at least 24 h before being processed for histology. Empty scaffolds were included as negative controls. Specimens were embedded in paraffin and subsequently, cut into 5 µm sections using a Leica RM2255 microtome. Orthoss required decalcification to facilitate the sectioning of the scaffold, using EDTA solution (250 g disodium EDTA and 1750 ml deionised water, pH 7.0) for 2–3 days. The slides were processed for a routine staining with haematoxylin and eosin (H&E), and scanned under bright-field mode using Nikon microscope E1000. Nuance V.3.0.1.2 software (Perkin Elmer) was used to acquire the images.

### Digestion of Scaffolds and Release of Cells

To release the cells from the scaffolds following the culture, the scaffolds were gently washed with PBS and subsequently, treated with 1% trypsin (Sigma–Aldrich) for 10 min at 37°C. More tightly attached cells were subsequently released using 0.25% collagenase (Stem Cell Technologies, Grenoble, France). For each scaffold, 0.5 ml collagenase was added for 30 min and incubated at 37°C with slight agitation using VIBRAX-VXR shaker (IKA, Staufen, Germany). The digested fraction was next passed through 70 µm cell strainer (BD falcon) to separate cells from the scaffold debris. Cells were then washed in PBS and re-suspended in 50 µl of blocking buffer (10% of mouse serum and human IgG1, Sigma–Aldrich)

to prevent nonspecific binding before being processed for flow-cytometry staining.

#### Surface Phenotype and Quantification of MSCs Released From Scaffolds

Flow-cytometry was performed to assess the standard phenotype of culture-expanded MSCs.<sup>22,23</sup> The antibodies against CD90 (Bio-Rad, Hertfordshire, UK), CD45, CD73, CD105, CD13, CD106, CD146, and CD166 (all from BD Biosciences) were used. To identify MSCs released after digestion of scaffolds, the antibodies against CD90, CD73, and CD45 were used. All antibodies were applied at the manufacturer's recommended concentrations and the staining was performed for 30 min at room temperature in the dark. Live/Dead<sup>®</sup> Violet Viability Kit (Molecular Probes, Life Technologies, Paisley, UK) was used to exclude debris from data analysis and to evaluate the proportions of live and dead cells. The total number of MSCs released from each scaffold was calculated using CountBright<sup>™</sup> absolute counting beads (Molecular probes, Invitrogen, UK) using the manufacturer's recommended formula: Cell count per  $\mu\text{l}$  = (number of live cell events/number of beads events)  $\times$  (assigned bead count of the bead lot/Volume of sample). The data were acquired on LSRII (BD Biosciences) and analysed using BD FACS Diva<sup>™</sup> software (BD Biosciences).

#### Proliferation of Culture-Expanded MSCs

To assess the proliferation of culture-expanded MSCs loaded on the bone scaffolds, these MSCs were first serum starved for 12 h in 1 g/l glucose containing DMEM medium to synchronize their cell cycle status before incubation with scaffolds.<sup>24</sup> On the day of experiment, MSCs were trypsinised and then labeled with 1  $\mu\text{M}$  of Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Cell Trace<sup>™</sup> CFSE Cell Proliferation Kit, Life technologies, Paisley, UK). Cells were then washed, re-suspended in Stem MACS media and incubated with each of three scaffolds for 3 h before being transferred to the culture. A part of MSCs not incubated with scaffolds was processed for flow-cytometry to determine "day 0" expression level of CFSE. After 4 days, the scaffolds were digested and MSCs were released and then stained for flow-cytometry to determine their CFSE levels. Overlapping histogram panels for CFSE staining were performed using Kalusa 1.3 analysis software (Beckman coulter).

#### Statistical Analysis

The graphs were prepared using the GraphPad Prism 6. All statistics were performed using IBM SPSS<sup>®</sup> 21 statistics software. The comparison of the numbers and percentages of attached or proliferated MSCs, and other cells between the three scaffolds were analyzed using Friedman's Two-way Analysis of Variance (ANOVA) test. Then, the pairwise comparisons were performed using Dunn–Bonferroni tests. To compare the number of aspirated BM MSCs between male/female or between younger/older donors, unpaired *t*-test was applied. The correlation was performed using Spearman's rho test.

## RESULTS

#### Attachment of Non-Cultured BM MSCs to Scaffolds

The total number of non-cultured MSCs attached to scaffolds was calculated by counting colony-forming MSCs before and after 3 h incubation between unprocessed BM and scaffolds (Fig. 1).

Experiments performed on 10 independent BM aspirates revealed that the total number of BM MSCs

attached to Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup>, was not significantly different (median values of 126 and 117 MSCs/100 mm<sup>3</sup> of scaffold, respectively,  $p = 0.791$ ) (Fig. 1A). However, the number of BM MSCs attached to Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> was significantly higher ( $\sim$ two fold,  $p = 0.001$  and  $p = 0.041$ , respectively) compared to Orthoss<sup>®</sup> (median 60 MSCs/100 mm<sup>3</sup> of scaffold, Fig. 1A). This indicated that the collagen-containing scaffolds were superior compared to Orthoss<sup>®</sup> in supporting the attachment of rare MSCs from unprocessed BM aspirates.

The number of attached MSCs was widely variable between donors (Fig. 1A) and significantly correlated with the initial counts of MSCs in BM aspirates independently of the scaffold type (Orthoss<sup>®</sup> collagen:  $p = 0.001$ , Orthoss<sup>®</sup>:  $p = 0.003$  and Vitoss<sup>®</sup>:  $p < 0.001$ ) (Fig. 1B). There was no statistical significant difference in the frequencies of aspirated MSCs between male and female donors (mean values 405 and 315 MSCs/ml of BM), whereas BM aspirates from older donors ( $>45$  years old) had fewer MSCs compared to younger donors ( $\leq 45$  years old) (mean values 163 and 532 MSCs/ml of BM, respectively,  $p = 0.0145$ ).

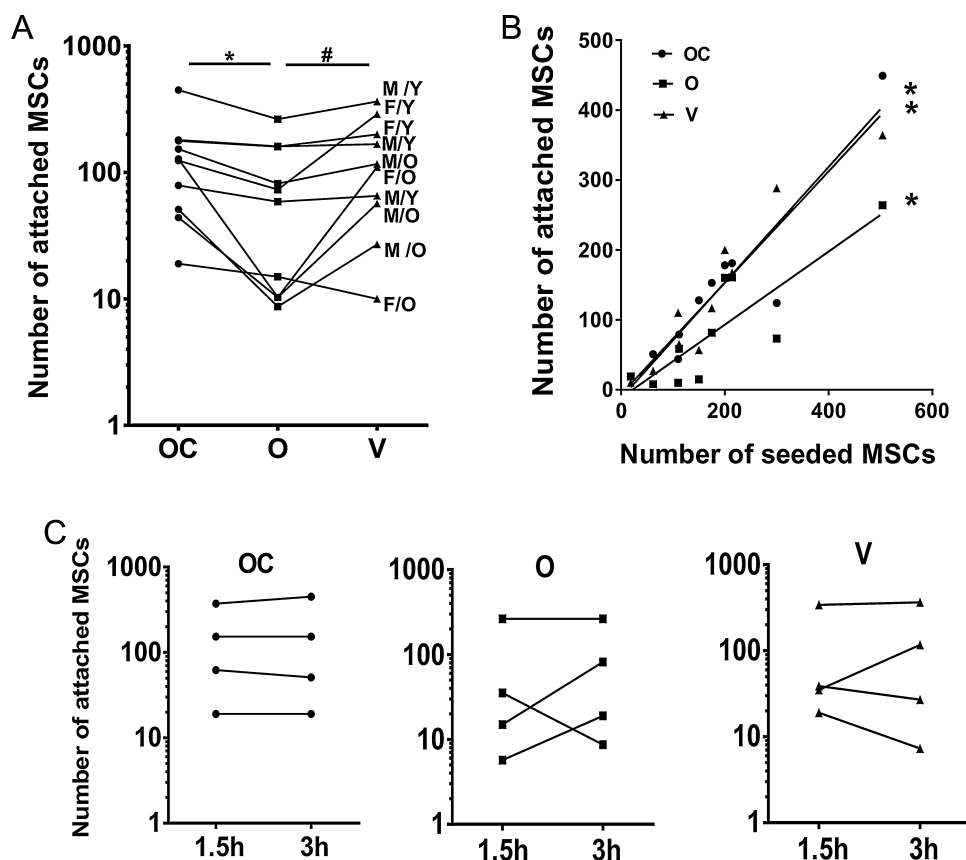
When MSC attachment data were reanalyzed according to the age and gender of donors, no preferential attachment of a certain group (male/female or young/old) was found. The numbers of attached BM MSCs from both male and female donors were similarly distributed on the scaffolds (Fig. 1A). In summary, scaffolds with high numbers of attached MSCs corresponded to BM aspirates from a "younger" group of donors, reflecting their higher initial frequencies in these donors.

The study of incubation times shorter than 3 h was clearly merited, considering scaffolds are loaded with BM aspirates in operating theatres. Using a subset of samples ( $n = 4$ ), we next investigated if shortening the incubation time by half could impair MSC attachment. Interestingly, no decrease was found in the number of MSCs attached to the three scaffolds following 1.5 h long incubation, compared to 3 h (Fig. 1C).

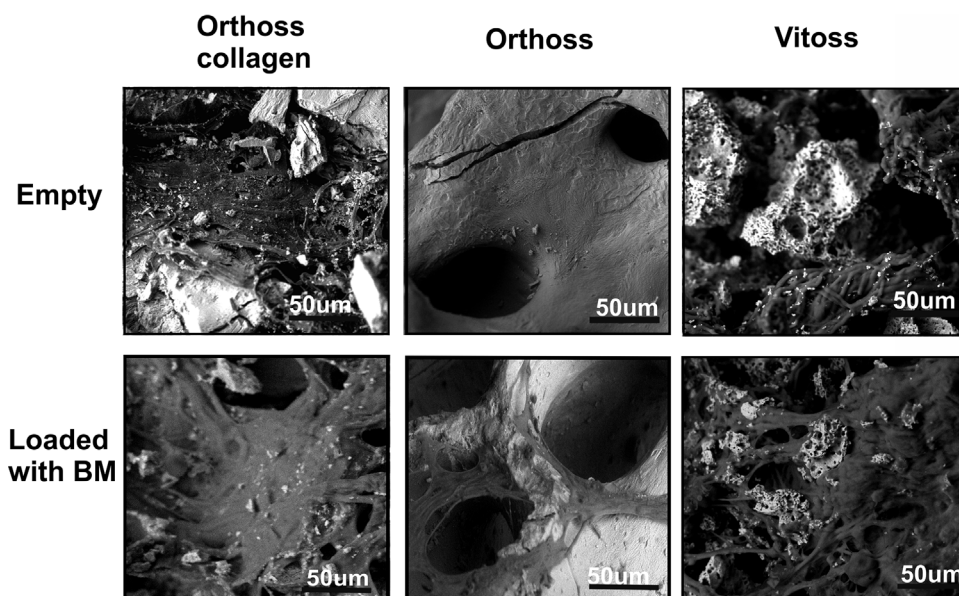
Overall, these data revealed that, despite the infrequency and variable numbers of MSCs in BM aspirates, these rare MSCs were able to attach to the tested scaffolds. Interestingly, the collagen-containing scaffolds (Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup>) have provided better support for the initial MSC attachment compared to the non-collagen-containing scaffold, Orthoss<sup>®</sup>.

#### Microscopic Visualization of MSC Attachment to Scaffolds

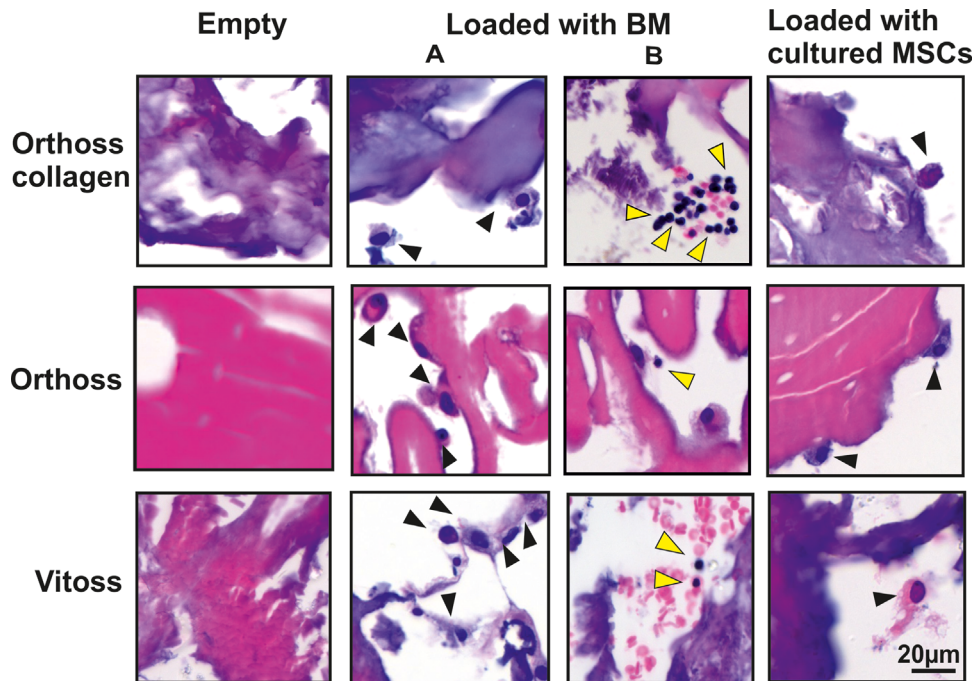
We next aimed to examine the surface of these scaffolds and to visualize cells, which attached and survived on the three scaffolds after 2-weeks of culture using ESEM and histology (Figs. 2 and 3). Using ESEM on empty scaffolds revealed their basic surface architecture. The surface of both of Vitoss<sup>®</sup> and Orthoss<sup>®</sup> collagen was mostly covered by collagen fibers with visible parts of bone mineral, in contrast to Orthoss<sup>®</sup>, which had a smooth surface of pure bone



**Figure 1.** Attachment of unprocessed BM MSCs to Orthoss<sup>®</sup> collagen, Orthoss<sup>®</sup>, and Vitoss<sup>®</sup>; (A) The number of MSCs attached to the three scaffolds (3 h incubation,  $n = 10$  donors,  $*p = 0.001$ ,  $^{\#}p = 0.041$ ). The numbers were calculated from MSC counts before and after loading of scaffolds with BM aspirate using CFU-F assay. OC: Orthoss<sup>®</sup> collagen, O: Orthoss<sup>®</sup>, and V: Vitoss<sup>®</sup>. M: male, F: female, O: old, Y: young. (B) The correlation between the numbers of seeded MSCs and the number of MSCs attached to the three scaffolds. \*Orthoss<sup>®</sup> collagen:  $r = 0.87$ ,  $p = 0.001$ , Orthoss<sup>®</sup>:  $r = 0.83$ ,  $p = 0.003$ , Vitoss<sup>®</sup>:  $r = 0.93$ ,  $p < 0.001$ . (C) The number of MSCs attached to three scaffolds after 1.5 h compared to 3 h incubation ( $n = 4$  donors).



**Figure 2.** The surface topography and MSC attachment on scaffolds using ESEM; Empty (top panels) or BM aspirate-loaded scaffolds (bottom panel) were examined after 2-week culture. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3.** Histological assessment of MSC attachment to scaffolds using H&E staining; Empty (left panels), BM aspirate-loaded (middle panels, A and B) and culture-expanded MSC-loaded (right panels) scaffolds after 2-week culture. Black arrows indicate putative MSCs and yellow arrows indicate other BM cells. Scale bar = 20 µm.

mineral (Fig. 2, top panels). For this reason, cells attached to the surface of Orthoss<sup>®</sup> were clearly visible as flat and branched cells bridging scaffold pores (Fig. 2, bottom middle panel). It was hard to detect similar cells on the surface of Vitoss<sup>®</sup> or Orthoss<sup>®</sup> collagen due to their surface coverage with collagen (Fig. 2, bottom left and right panels). However, the smoothness of collagen fibres and increased coverage of mineral parts on the surface of these scaffolds when compared to controls suggested a presence of attached cells.

The inner structure of scaffolds was examined using H&E-stained sections of the empty scaffolds (Fig. 3, left panel). The scaffolds seeded with culture-expanded MSCs and used as positive controls, showed a presence of elongated or rounded cells mostly attached to or near the surface of the three scaffolds (Fig. 3, right panel). Cells resembling culture-expanded MSCs were also detected on the surface and inside the scaffolds loaded with BM aspirate (Fig. 3, middle panel, A). Additionally, smaller round cells were also found inside scaffolds loaded with BM aspirates (Fig. 3, middle panel, B). This indicated that a variety of BM-derived cells could attach and survive inside these scaffolds.

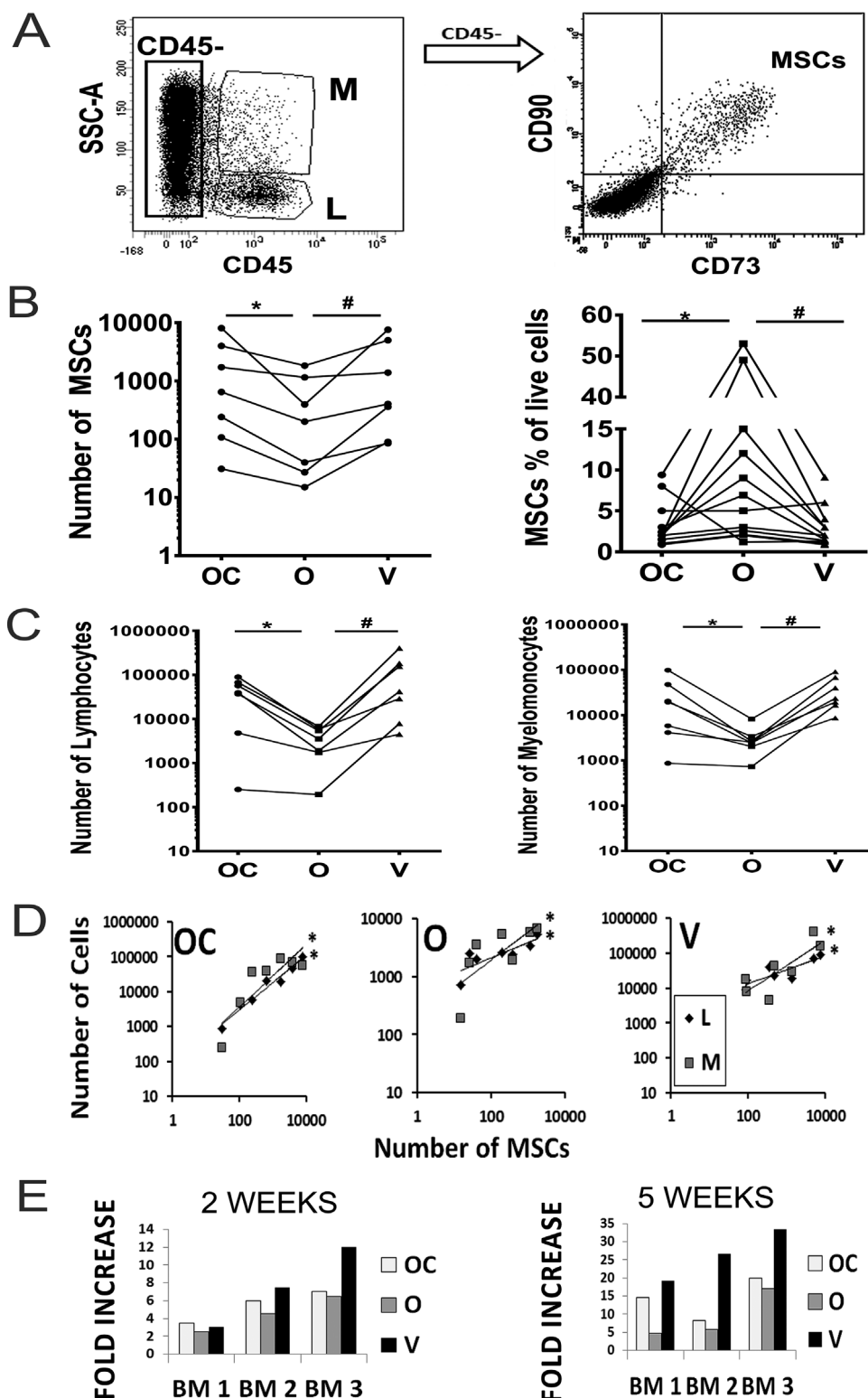
#### Quantification of BM MSCs Released From Scaffolds Following In Vitro Culture

Cells released from scaffolds were next analyzed by flow-cytometry in order to confirm the presence of MSCs, and detect which of the three examined scaffolds best supported the survival of MSCs (Fig. 4). Live cells were identified based on positive staining with live cell marker, Calcein violet and negative

staining with Aqua dye, which only stains dead cells.<sup>25</sup> The percentages of dead cells (Aqua positive cells after exclusion of debris) in relation to total released cells were similar in all three scaffolds (mean: 29%, 33%, and 30% for Orthoss<sup>®</sup> collagen, Orthoss<sup>®</sup> and Vitoss<sup>®</sup>, respectively). Based on cell scattering characteristics and CD45 expression, the lymphocytic lineage cells were detected as CD45<sup>bright</sup>SSC<sup>low</sup> and myelomonocytic lineage cells as CD45<sup>med</sup>SSC<sup>med</sup> (Fig. 4A).<sup>26</sup> Within the CD45-negative fraction, MSCs were identified as CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> cells (Fig. 4A).

After 2-weeks of culture, the numbers of live MSCs released from Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> were significantly higher (nearly threefold and twofold respectively,  $p=0.010$  and  $p=0.023$ , respectively) compared to Orthoss<sup>®</sup> (Fig. 4B, left panel). In contrast, the difference between the number of live MSCs released from Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss was minimal (Fig. 4B, left panel). This indicated that the collagen-containing scaffolds provided a greater support for the survival of BM MSCs. However, the percentages of MSCs in relation to total live cells released from Orthoss<sup>®</sup> were significantly higher compared to Orthoss<sup>®</sup> collagen (threefold,  $p=0.032$ ) and Vitoss<sup>®</sup> (3.5-fold,  $p=0.024$ ) (Fig. 4B, right panel).

The number of lymphocytic and myelomonocytic cells released from Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> was higher than those released from Orthoss<sup>®</sup> (nearly 10-fold & 11-fold,  $p=0.045$  and  $p=0.004$  for both lymphocytic and myelomonocytic cells, respectively) (Fig. 4C). However, there was no significant difference between the number of these cells released from Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup>. Additionally,



**Figure 4.** Quantification of MSCs and other BM cells released from BM-loaded scaffolds; (A) Gating strategy using flow-cytometry: Lymphocytic cells (L) as CD45<sup>bright</sup>SSC<sup>low</sup>, Myelomonocytic cells (M) as CD45<sup>med</sup>SSC<sup>med</sup> and MSCs as CD45<sup>med</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> cells. (B) Total numbers of MSCs released from the scaffolds following 2-week culture (left panel,  $n = 7$  donors)  $^*p = 0.010$ ,  $^{\#}p = 0.023$ . Counting beads were used for absolute quantification. The percentage of MSCs out of total live cells released from the scaffolds following 2-week culture (right panel,  $n = 12$  donors).  $^*p = 0.032$ ,  $^{\#}p = 0.024$ . OC: Orthoss<sup>®</sup> collagen, O: Orthoss<sup>®</sup>, and V: Vitoss<sup>®</sup>. (C) Total numbers of lymphocytic cells (left panel) and myelomonocytic cells (right panel) released from the scaffolds following 2-week culture ( $n = 7$  donors). For both; panels  $^*p = 0.045$ ,  $^{\#}p = 0.004$ . (D) The correlation between the number of MSCs and the number of lymphocytic (L) and myelomonocytic cells (M) released from the three scaffolds following 2-week culture. Orthoss<sup>®</sup> collagen:  $R = 0.99$ ,  $^*p < 0.001$  and  $r = 0.85$ ,  $^*p = 0.014$ . Orthoss<sup>®</sup>:  $R = 0.82$ ,  $^*p = 0.023$  and  $r = 0.89$ ,  $^*p = 0.007$ . Vitoss<sup>®</sup>:  $R = 0.85$ ,  $^*p = 0.014$  and  $r = 0.8$ ,  $^*p = 0.036$  for MSCs versus myelomonocytic and lymphocytic cells, respectively. (E) Fold increase in MSC numbers released from scaffolds cultured for 2 and 5 weeks relative to MSC number counted after 1-week culture. Samples from three different BM donors are shown.



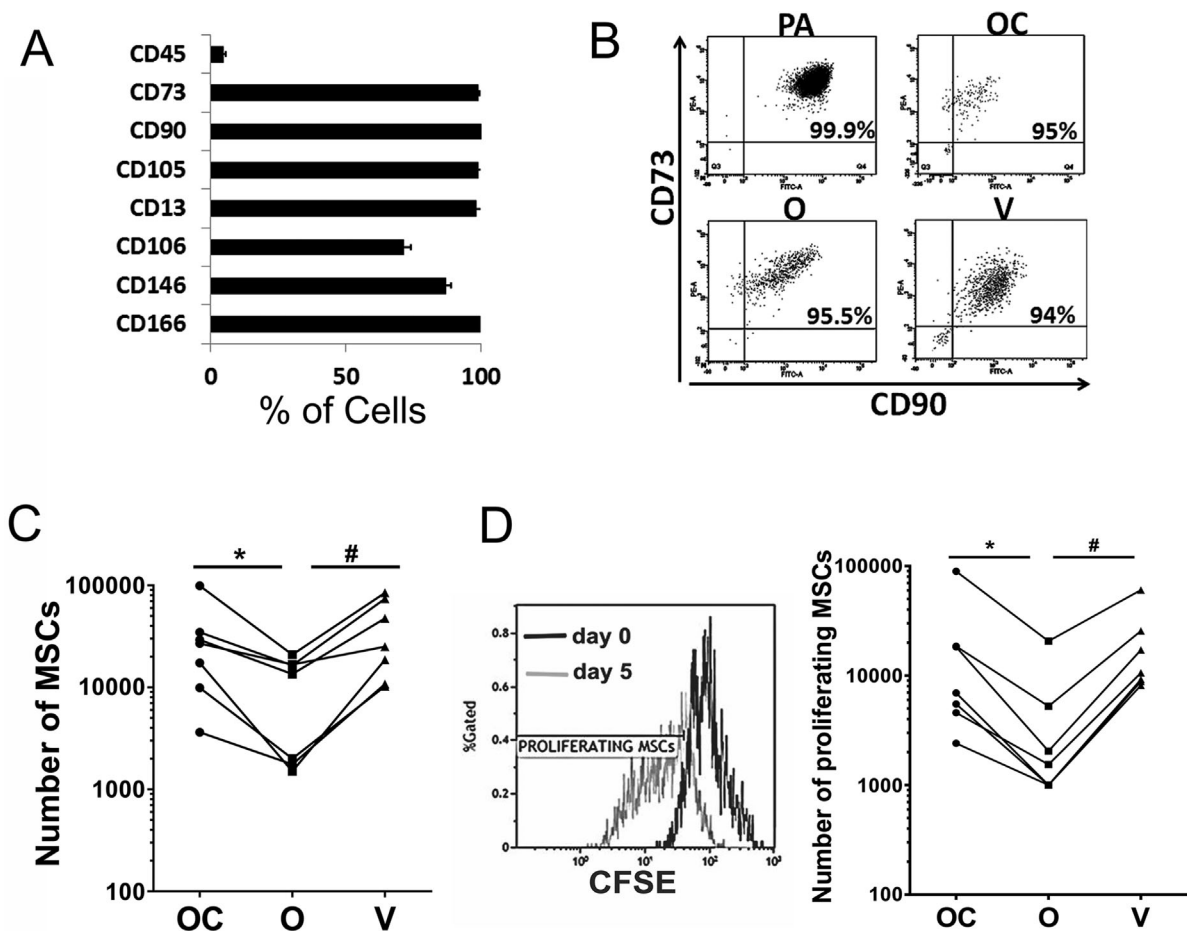
we observed significant positive correlations between the number of released MSCs and lymphocytic or myelomonocytic cells, respectively (Orthoss<sup>®</sup> collagen:  $p < 0.001$  and  $p = 0.014$ , Orthoss<sup>®</sup>:  $p = 0.023$  and  $p = 0.007$  and Vitoss<sup>®</sup>:  $p = 0.014$  and  $p = 0.036$ ) (Fig. 4D). These data demonstrated that the collagen-containing scaffolds played a positive role in supporting the survival of MSCs as well as different types of BM cells.

Comparing Figures 1 and 4, it was clear that the numbers of BM MSCs attached to the scaffolds were lower than the numbers of BM MSCs released from scaffolds after 2-weeks of culture. This indicated that BM MSCs were proliferating inside these scaffolds. To compare how effectively the scaffolds supported the proliferation of MSCs, three different BM aspirates were used to load scaffolds and subsequently, cultured for 1, 2, and 5 weeks in a time-course fashion (Fig. 4E). We then compared the numbers of MSCs released from the scaffolds after 2 and 5 weeks of culture relative to the numbers

measured after 1-week of culture. The data demonstrated that the increase of MSC counts either after 2 or 5 weeks culture on Vitoss<sup>®</sup> or Orthoss<sup>®</sup> collagen was greater compared to that on Orthoss<sup>®</sup> (Fig. 4E). These data indicated that all three scaffolds supported the proliferation of attached BM MSCs, but collagen-containing scaffolds outperformed Orthoss<sup>®</sup> within that respect.

#### The Proliferation of Culture-Expanded MSCs Inside Scaffolds

To confirm that collagen-containing scaffolds support the proliferation of MSCs better than Orthoss<sup>®</sup>, we seeded the three scaffolds with a pure population of culture-expanded MSCs. Before seeding on scaffolds, culture-expanded MSCs were characterized by flow-cytometry using the standard MSC markers.<sup>22,23</sup> All culture-expanded MSCs used in these experiments were >90% positive for CD73, CD90, CD105, CD166, CD146, and CD13, 80% positive for CD106, and were negative for CD45 (Fig. 5A).



**Figure 5.** The proliferation of culture-expanded MSCs inside scaffolds; (A) The surface phenotype of culture-expanded MSCs before being seeded on scaffolds ( $n = 4$  donors). Error bars indicate standard deviation. (B) The percentages of CD90<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> MSCs released from scaffolds following 2-week culture compared to plastic adherent MSCs. OC: Orthoss<sup>®</sup> collagen, O: Orthoss<sup>®</sup>, V: Vitoss<sup>®</sup>, and PA: plastic adherent. (C) Total numbers of culture-expanded MSCs after 4 days of culture on scaffolds ( $n = 7$  donors). \* $p = 0.046$ , # $p = 0.004$ . (D) Left panel: CFSE-staining levels of culture-expanded MSCs released from a scaffold on day 5 (grey histogram) compared to its levels before seeding (day 0, black histogram). Right panel: The total numbers of MSCs that proliferated during 4 days of in vitro culture on scaffolds ( $n = 7$  donors) \* $p = 0.047$ , # $p = 0.004$ .

Culture-expanded MSCs seeded on scaffolds were released and characterized using Live/Dead cell markers, CD45, CD73, and CD90. As expected, MSC population was predominant (Fig. 5B). Consistent with data obtained with BM aspirates, the total number of culture-expanded MSCs released from Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> was significantly higher compared to those extracted from Orthoss<sup>®</sup> ( $p = 0.046$  and  $p = 0.004$ , respectively) (Fig. 5C) confirming that collagen-containing scaffolds support better the survival of MSCs.

To quantify the proliferation of MSCs inside each of the three scaffolds, CFSE-labeled MSCs were incubated with scaffolds then cultured for 4 days. The proportions of MSCs that have proliferated at day 5, i.e., have a reduced expression of CFSE following cell division compared to day 0 (Fig. 5D, left panel) were quantified. The data demonstrated that the numbers of proliferated MSCs inside Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> were comparable, however, significantly greater compared to Orthoss<sup>®</sup> (4.3 and 6.8-fold, respectively,  $p = 0.047$  and  $p = 0.004$ , respectively) (Fig. 5D, right panel). Altogether, these data have confirmed that the presence of collagen as a component of bone scaffolds provided a better support for the proliferation of MSCs.

## DISCUSSION

The choice of scaffolds for the treatment of bone defects, as biomechanical fillers or as carriers for MSCs, is critical.<sup>27</sup> As a prerequisite for bone tissue regeneration, MSCs need to attach and proliferate on scaffolds in order to subsequently differentiate and integrate into the surrounding tissues. Here, we used as a model, two scaffolds of the same basic composition (bovine hydroxyapatite) to explore the effect of collagen incorporation on scaffold colonization by BM MSCs. Using unprocessed BM aspirates, our data showed that the addition of collagen to Orthoss<sup>®</sup> collagen improved the attachment, survival and proliferation of BM MSCs compared to Orthoss<sup>®</sup>. A synthetic scaffold, Vitoss<sup>®</sup>, was included as an additional collagen-containing scaffold and showed similar results to Orthoss<sup>®</sup> collagen. To best of our knowledge, this study is the first to quantitatively assess the attachment, survival and proliferation of rare human non-cultured (unprocessed) BM MSCs on these scaffolds.

The numbers of MSCs in BM aspirates are well known to be low and variable because of sampling and donor related factors particularly aging, which negatively affects the number of BM MSCs.<sup>28,29</sup> Our results revealed a large variation in the numbers of MSCs attached to scaffolds, independent on the scaffold type, which in turn was related to the differences of the initial quantity of MSCs in BM aspirates. The increase in donor age was associated with the lower numbers of aspirated and hence attached MSCs.

We have confirmed the morphology of BM MSCs growing on Orthoss<sup>®</sup> as flat and interconnected cells bridging the pores of scaffold.<sup>19</sup> However, cell attach-

ment was not clear on Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup>. For quantification of MSCs following their enzymatic release from cultured scaffolds, we therefore developed a flow-cytometry based method. In contrast to other studies, in which MSC growth inside scaffolds was tested using confocal/electron microscopy or via measurement of total cellular DNA,<sup>19,30,31</sup> the use of flow-cytometry in our study has enabled us to quantitatively assess scaffold colonization by MSCs as well as by other BM cells. In one previous study, a flow-cytometry assay was used to assess the viability of culture-expanded MSCs seeded on 3D construct made of a composite of hydroxyapatite and  $\beta$ -TCP, but the assay was not quantitative.<sup>32</sup>

Our data shows that the number of BM MSCs released from Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> after 2-week in vitro culture was higher than Orthoss<sup>®</sup>, clearly indicating that collagen-containing scaffolds provided a more favourable environment for MSC attachment and proliferation. Interestingly, the attachment and proliferation of MSCs from BM aspirates into Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> were similar despite the difference in their mineral composition. Complementary to our results, Orthoss<sup>®</sup> collagen and Vitoss<sup>®</sup> have been shown to equally support the osteogenic differentiation of MSCs.<sup>33</sup> The osteogenic potential of MSCs colonizing the scaffolds was not tested in this study but we have shown previously that Orthoss<sup>®</sup> supports osteogenic differentiation of MSCs after 3-weeks in culture.<sup>19</sup> Additionally, it has been shown that Vitoss<sup>®</sup> supports the in vitro and in vivo osteogenic differentiation of MSCs.<sup>34</sup>

It has been previously demonstrated that collagen-mediated induction of MSC survival is a result of its interaction with membrane-bound integrins on MSC surface.<sup>35</sup> Our study demonstrates that the incorporation of collagen into a natural bovine bone scaffold supports the survival and proliferation of both culture-expanded and non-expanded MSCs. Consistently, the addition of collagen to nanocellulose- or chitosan-made scaffolds has been shown to promote the attachment of culture-expanded MSCs into these scaffolds.<sup>36,37</sup> Uniquely, we have evaluated the colonization of scaffolds by other BM cells, and not only MSCs. Our results demonstrated that relative percentages of BM MSCs inside Orthoss<sup>®</sup> were higher compared to collagen-containing scaffolds because the latter scaffolds were more supportive for the attachment and survival of other BM cells (myelomonocytic or lymphocytic cells) in addition to MSCs. In agreement, a collagen-containing scaffold has been shown to provide an attachment to MSC as well as neutrophils in an animal model of dental bone loss.<sup>38</sup> Importantly, regardless of scaffold type, we detected positive correlations between the quantities of BM MSCs and myelomonocytic or lymphocytic cells released from scaffolds. These findings support the possibility that BM-derived hematopoietic cells could have an additional positive effect on MSC growth on different bone

scaffolds. Immune cells have been shown to enhance the proliferation of animal BM MSCs.<sup>39,40</sup> The inclusion of other BM cells such as endothelial cells could also support MSC proliferation.<sup>41</sup> Therefore, our study provides the platform for future investigation of the effect of other BM cells on MSC survival, proliferation and functions when loaded on osteoconductive scaffolds.

## CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVE

The preparation of culture-expanded MSCs for clinical use is expensive and requires a complicated process of regulation to ensure the clinical safety.<sup>42</sup> Furthermore, culture-expanded MSCs are seeded into scaffolds at very high densities, which do not represent their physiological densities in human bone<sup>23</sup> or BM aspirates.<sup>28,43,44</sup> Our investigation reflects real clinical procedure and shows that non-cultured MSCs from unprocessed BM aspirates, despite their known low frequency as well as donor and aspiration related variation,<sup>28,43,45,46</sup> can attach and proliferate on bone scaffolds. Importantly, our data revealed that the attachment, survival and proliferation of MSCs were superior on collagen-containing scaffolds, a finding which supports their broader use for orthopaedic clinical applications.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors have a substantial contribution to this work. PVG, EJ, and JE were responsible for the study conception and design. JE and CS have conducted all experimental work and data acquisition. Data analysis and statistics were performed by JE, CS, and EJ. Manuscript preparation and writing was completed by JE, EJ, and PVG. All authors have read and approved the final submitted version.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the clinical orthopaedic team at Leeds general infirmary hospital particularly Mr. Boon Tan for providing samples. The authors gratefully acknowledge Dr. Thomas Baboolal, Mrs. Jackie Hudson, Mr. Mike Shires and Dr. Sally Boxall for the technical help and advice. EJ and PVG are partly supported by NIHR-Leeds Musculoskeletal Biomedical Research Unit (LMBRU). JE was supported by a grant from Geistlich Pharma; EJ and PVG were grant holders but received no salary from this grant. JE is also affiliated with the department of clinical pathology, Faculty of Medicine, Mansoura University, Egypt. CS was a beneficiary of Fellowships by Fundación Profesor Novoa Santos (INIBIC-CHUAC, Spain) and Erasmus from the University of A Coruna, Spain.

## REFERENCES

- Gomez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, et al. 2015. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* 70:93–101.
- De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, et al. 2007. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89:649–658.
- Qvick LM, Ritter CA, Muttly CE, et al. 2013. Donor site morbidity with reamer-irrigator-aspirator (RIA) use for autogenous bone graft harvesting in a single centre 204 case series. *Injury* 44:1263–1269.
- Calori GM, Colombo M, Mazza EL, et al. 2014. Incidence of donor site morbidity following harvesting from iliac crest or RIA graft. *Injury* 45:S116–S120.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. 2005. Bone substitutes: an update. *Injury* 36:S20–S27.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, et al. 2014. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 9:18.
- Jones E, Yang X. 2011. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury* 42:562–568.
- Pittenger MF. 2008. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 449:27–44.
- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, et al. 1998. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80:985–996.
- Liu G, Zhao L, Zhang W, et al. 2008. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 19:2367–2376.
- Crowley C, Wong JM, Fisher DM, et al. 2013. A systematic review on preclinical and clinical studies on the use of scaffolds for bone repair in skeletal defects. *Curr Stem Cell Res Ther* 8:243–252.
- Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. 2007. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 13:947–955.
- Campana V, Milano G, Pagano E, et al. 2014. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med* 25:2445–2461.
- Chen XD. 2010. Extracellular matrix provides an optimal niche for the maintenance and propagation of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90:45–54.
- Reilly GC, Engler AJ. 2010. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech* 43:55–62.
- Yang XB, Bhatnagar RS, Li S, et al. 2004. Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. *Tissue Eng* 10:1148–1159.
- Qu Z, Yan J, Li B, et al. 2010. Improving bone marrow stromal cell attachment on chitosan/hydroxyapatite scaffolds by an immobilized RGD peptide. *Biomed Mater* 5:065001.
- Cox G, Boxall SA, Giannoudis PV, et al. 2012. High abundance of CD271(+) multipotential stromal cells (MSCs) in intramedullary cavities of long bones. *Bone* 50:510–517.
- Kouroupis D, Baboolal TG, Jones E, et al. 2013. Native multipotential stromal cell colonization and graft expander potential of a bovine natural bone scaffold. *J Orthop Res* 31:1950–1958.
- Kim J, Ma T. 2012. Regulation of autocrine fibroblast growth factor-2 signaling by perfusion flow in 3D human mesenchymal stem cell constructs. *Biotechnol Prog* 28:1384–1388.
- Ana Rita Duarte CJFM, Rui Reisa L. 2010. Enzymatic degradation of 3D scaffolds of starch-poly-(ε-caprolactone) prepared by supercritical fluid technology. *Polym Degrad Stabil* 95:2110–2211.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
- Jones E, English A, Churchman SM, et al. 2010. Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on

- uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis Rheum* 62:1944–1954.
24. Chen M, Huang J, Yang X, et al. 2012. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS ONE* 7:e28203.
  25. Baboolal TG, Boxall SA, El-Sherbiny YM, et al. 2014. Multipotential stromal cell abundance in cellular bone allograft: comparison with fresh age-matched iliac crest bone and bone marrow aspirate. *Regen Med* 9:593–607.
  26. Pattanapanyasat K, Sukapirom K, Kowawisatsut L, et al. 2008. New BD FACSCount CD4 reagent system for simultaneous enumeration of percent and absolute CD4 T-lymphocytes in HIV-1-infected pediatric patients. *Cytometry Part B Clin Cytom* 74:S98–106.
  27. Janicki P, Schmidmaier G. 2011. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 42:S77–S81.
  28. Cuthbert R, Boxall SA, Tan HB, et al. 2012. Single-platform quality control assay to quantify multipotential stromal cells in bone marrow aspirates prior to bulk manufacture or direct therapeutic use. *Cytotherapy* 14:431–440.
  29. Stolzinger A, Jones E, McGonagle D, et al. 2008. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129:163–173.
  30. Polini A, Pisignano D, Parodi M, et al. 2011. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS ONE* 6:e26211.
  31. Tsiiridis E, Ali Z, Bhalla A, et al. 2009. In vitro proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells on hydroxyapatite versus human demineralised bone matrix with and without osteogenic protein-1. *Expert Opin Biol Ther* 9:9–19.
  32. Gambelin AL, Renaud A, Charrier C, et al. 2014. Osteoblastic and osteoclastic differentiation of human mesenchymal stem cells and monocytes in a miniaturized three-dimensional culture with mineral granules. *Acta Biomater* 10:5139–5147.
  33. Payer M, Lohberger B, Stadelmeyer E, et al. 2010. Behaviour of multipotent maxillary bone-derived cells on beta-tricalcium phosphate and highly porous bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res* 21:699–708.
  34. Roberts SJ, Geris L, Kerckhofs G, et al. 2011. The combined bone forming capacity of human periosteal derived cells and calcium phosphates. *Biomaterials* 32:4393–4405.
  35. Popov C, Radic T, Haasters F, et al. 2011. Integrins alpha2beta1 and alpha11beta1 regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell Death Dis* 2:e186.
  36. Kuzmenko V, Samfors S, Hagg D, et al. 2013. Universal method for protein bioconjugation with nanocellulose scaffolds for increased cell adhesion. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33:4599–4607.
  37. Ragetly GR, Griffon DJ, Lee HB, et al. 2010. Effect of collagen II coating on mesenchymal stem cell adhesion on chitosan and on reacylated chitosan fibrous scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 21:2479–2490.
  38. Araujo MG, Liljenberg B, Lindhe J. 2010. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 21:55–64.
  39. Seifert M, Lubitz A, Trommer J, et al. 2012. Crosstalk between immune cells and mesenchymal stromal cells in a 3D bioreactor system. *Int J Artif Organs* 35:986–995.
  40. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89:1235–1249.
  41. Saleh FA, Whyte M, Genever PG. 2011. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. *Eur Cell Mater* 22:242–257.
  42. Torre ML, Lucarelli E, Guidi S, et al. 2015. Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. *Stem Cells Dev* 24:677–685.
  43. Veyrat-Masson R, Boiret-Dupre N, Rapatel C, et al. 2007. Mesenchymal content of fresh bone marrow: a proposed quality control method for cell therapy. *Br J Haematol* 139:312–320.
  44. Guimaraes JA, Duarte ME, Fernandes MB, et al. 2014. The effect of autologous concentrated bone-marrow grafting on the healing of femoral shaft non-unions after locked intramedullary nailing. *Injury* 45:S7–S13.
  45. Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Blanco-Gelaz MA, et al. 2013. Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy. *Transplant Proc* 45:434–439.
  46. Hernigou P, Homma Y, Flouzat Lachaniette CH, et al. 2013. Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. *Int Orthop* 37:2279–2287.

# Stem Cell Therapy for Bone and Cartilage Defects – Can Culture-expansion be Avoided?

Elena Jones<sup>1\*</sup> and Clara Sanjurjo-Rodriguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine, University of Leeds, Leeds, UK

<sup>2</sup>Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña (CHUAC), CIBER-BBN-Cellular Therapy Area, CHUAC. Cátedra Bioibérica-University of A Coruña. A Coruña, Spain

Skeletal tissues including bone and cartilage experience significant mechanical stresses following normal physical activity. In bone, resultant microcracks are continuously repaired as a result of coordinated activity of osteoblasts, their progenitors – multipotential stromal/stem cells (MSCs) and osteoclasts, the bone-resorbing cells [1]. Physiological cartilage repair mechanisms are less well understood, but could be potentially mediated by MSCs present in cartilage superficial layer [2,3], synovium [4,5] or synovial fluid [6,7].

Significant damages to bone and cartilage can occur as a result of acute injury (trauma) or due to chronic disease (such as osteoarthritis). In acute settings, the last two decades have witnessed a significant advance in tissue engineering approaches to repair bone in cartilage, with the use of scaffolds seeded with large numbers of culture-amplified MSCs. However, more recent research has indicated that loading scaffolds with culture-expanded stem cells may not be absolutely required, and depends on the nature and size of the defect [8,9]. This Editorial will highlight recent advances in bone and cartilage repair strategies based on enhancing the recruitment of endogenous MSCs into the defect areas.

## Bone Repair

Fracture is a typical example of acute injury to bone that normally repairs itself. Non-union (failure to repair) commonly occurs when bone loss is too large (a critical-size defect) or when a patient presents with co-morbidities, such as diabetes, smoking, or high blood pressure [10]. The repair of critical-size defects requires the provision of mechanical stability and the presence of sufficient numbers of MSCs and vascular progenitors at the repair site [11].

The first successful tissue-engineering constructs to repair critical size defects in humans were based on culture-expanded bone marrow MSCs seeded on macroporous hydroxyapatite scaffolds [12]. Although they were implanted over a decade ago, the uptake of this technology in general clinical practice remains low; this is most likely due to the requirement of two surgeries (for MSC harvesting and implantation), difficulties in regulating the safety of such complex cellular products and the associated high costs of therapy. Instead, a so called Ilizarov distraction/bone transfer technique remains one of the most common methods for large defect reconstruction [13]. In basic terms, it relies on stabilizing the biomechanics and reducing the distance between the bone ends, followed by a very slow and controlled ‘stretching’ thus allowing a newly-formed callus tissue to be gradually vascularized and remodeled. It is believed that in this technique, the repair cells (MSCs) originate from the neighboring tissues such as periosteum [14]. As an alternative, pieces of autograft bone, containing patient’s own MSCs and a bone scaffold, are placed inside the defect area; the remaining bone void is filled with a so called ‘graft expander’, normally a synthetic scaffold, and mechanically stabilized. Graft material can be additionally loaded with concentrated BM aspirate from the same patient in order to provide additional MSCs [8,15,16].

The success of these empirical surgical approaches suggests that even for very large bone defects culture-expanding MSCs to increase their numbers million-fold may not be necessary. Instead, the provision of correct biomechanical environment seems to be the key, coupled with a scaffold that permits colonization by neighboring tissue-resident MSCs. Potent chemokine molecules such as stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) and monocyte-specific chemokine 3 (MCP-3) may facilitate further recruitment of MSCs and subsequent graft vascularization in vivo [17-19]. Similar strategies based on manipulating resident MSCs for cartilage tissue regeneration are illustrated below.

## Cartilage Repair

It is well-recognized that cartilage repair critically depends on the depth of a defect; full-thickness (osteochondral) defects that penetrate into the subchondral bone repair much better than partial-thickness (chondral) defects that commonly fail to repair [20]. This difference can be explained by larger numbers of MSCs present in subchondral bone [21,22] as opposed to their relative paucity in cartilage [2,3] or synovial fluid [6,7]. A surgical procedure called microfracture remains the gold standard for the treatment of isolated cartilage defects [23]; in this technique drilling into the subchondral bone plate creates a blood clot that is believed to have two valuable functions: first, it serves as a source of chemokines bringing subchondral bone MSCs to the repair site and second, it acts as a fibrin-based natural scaffold allowing retention, proliferation and chondrogenic differentiation of migrated MSCs [22].

Although it is generally assumed that MSCs residing in subchondral bone cavities are chiefly responsible for cartilage repair following microfracture, other joint-resident MSCs as synovium MSCs [5], synovial fluid MSCs [24] or superficial cartilage MSCs [2,3] could be also involved, particularly since these MSC types are known to possess high chondrogenic potentials [24,25] and to have a direct access to cartilage. Recently, Sharma et al. [26] detected the presence of synovial fluid in the defect areas three weeks after implantation of empty hydrogel-based scaffolds, combined with microfracture, in fifteen patients with isolated cartilage lesions. MSCs injected into the

**\*Corresponding author:** Elena Jones, Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine, Room 5.24 Clinical Sciences Building, St James's Hospital, Leeds, LS9 7TF, UK, Tel: +44 113 206 5647; E-mail: [msje@leeds.ac.uk](mailto:msje@leeds.ac.uk)

**Received** January 21, 2014; **Accepted** January 23, 2014; **Published** January 25, 2014

**Citation:** Jones E, Sanjurjo-Rodriguez C (2014) Stem Cell Therapy for Bone and Cartilage Defects – Can Culture-expansion be Avoided? J Stem Cell Res Ther 4: e118. doi:10.4172/2157-7633.1000e118

**Copyright:** © 2014 Jones E, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

joint space have been found in regenerated cartilage and meniscus [27], proving that these MSC could migrate through the fluid and reach the damaged areas of cartilage. Finally, the penetration of host cells into the defect site, ‘assumedly from the surrounding marrow and/or synovial spaces’, has been eloquently shown in Quintavalla et al. study [28].

How these endogenous MSCs are recruited into cartilage defects remains unclear. In a case of microfracture, a passive release of MSCs from the subchondral bone or the bone marrow is possible; however it is likely to be followed by their active migration driven by a simultaneous release of potent chemokine molecules into the synovial fluid [29]. Recently, several chemokines present in the synovial fluid, such as CCL25, CXCL10 and XCL1 were implicated in these migration processes [30]. Platelet-derived growth factors (PDGFs), concentrated inside the fibrin clot [31] and shown to be chemotactic for MSCs [32], could be also involved. These PDGFs could influence MSC migration, as well as their subsequent proliferation [33], differentiation and matrix synthesis.

It can be envisaged that in principle, similar MSC migration mechanisms could be re-created with the use of ‘smart’ scaffolds placed in the defect site. In order to develop these new approaches, a better knowledge of the types of chemokines and their corresponding receptors on the surface of different types of MSCs is needed. For example, implantation of scaffolds loaded with TGFβ3 has led to excellent repair, by endogenous cell homing, in a rabbit model [34]. Migration of human synovial MSCs and their infiltration into similar scaffolds was improved with the creation of a stable gradient of SDF-1/CXCL12 [35]. The most recent work from the same laboratory has highlighted ‘the need to test multiple cytokines concurrently due to synergistic or antagonistic effects’ [36].

MSCs from different tissues possess different migration potentials towards the same chemokine because they express different patterns of the corresponding chemokine receptors [37-39]. Cultured MSCs lose a full repertoire of their chemokine receptors after extensive passaging [37]. Further work is therefore needed to isolate uncultured MSCs from the joint tissues, such as synovium, and to investigate their chemokine receptor expression and the chemokine responsiveness prior to in vitro culture. This knowledge would help to design novel scaffolds, loaded with specific chemokines, in order to attract endogenous MSCs into the sites of cartilage damage.

## Conclusion

Recent evidence suggests that manipulating the migration of endogenous MSCs from tissues surrounding bone or cartilage defects could represent a viable alternative to traditional tissue engineering approaches with scaffolds seeded with culture-expanded MSCs. Further work is needed to better understand the in vivo signaling mechanisms responsible for physiological chemokine releases post-injury [40] as well as to study the cellular interactions between migrated MSCs and other cells resident in damaged tissues [41].

## Acknowledgements

Clara Sanjurjo-Rodriguez is beneficiary of an Erasmus fellowship from University A Coruna (Spain).

## References

- Bielby RC, Jones EA, McGonagle DG (2007) The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* S26-32.
- Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, et al. (2004) The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell*

*Sci* 117: 889-897.

- Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, et al. (2010) Identification and Clonal Characterisation of a Progenitor Cell Sub-Population in Normal Human Articular Cartilage. *PLoS ONE* 5: e13246.
- De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism* 44: 1928-1942.
- Kurth TB, Dell’Accio F, Crouch V, Augello A, Sharpe PT, et al. (2011) Functional Mesenchymal Stem Cell Niches in Adult Mouse Knee Joint Synovium In Vivo. *Arthritis Rheum* 63: 1289-1300.
- Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, et al. (2004) Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 817-827.
- Morito T, Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, et al. (2008) Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology* 47: 1137-1143.
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV (2011) Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 9: 66.
- Barry F, Murphy M (2013) Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol* 9: 584-594.
- Borrelli J Jr, Pape C, Hak D, Hsu J, Lin S, et al. (2012) Physiological Challenges of Bone Repair. *J Orthop Trauma* 26: 708-711.
- Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D (2007) Fracture healing: The diamond concept. *Injury* 38: S3-S6.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, et al. (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344: 385-386.
- Catagni MA, Guerreschi F, Lovisetti L (2011) Distraction osteogenesis for bone repair in the 21st century: Lessons learned. *Injury* 42: 580-586.
- Amir LR, Everts V, Bronckers ALJJ (2009) Bone regeneration during distraction osteogenesis. *Odontology* 97: 63-75.
- Kouroupis D, Baboolal TG, Jones E, Giannoudis PV (2013) Native Multipotential Stromal Cell Colonization and Graft Expander Potential of a Bovine Natural Bone Scaffold. *J Orthop Res* 31: 1950-1958.
- Evans NR, Davies EM, Dare CJ, Oreffo ROC (2013) Tissue engineering strategies in spinal arthrodesis: the clinical imperative and challenges to clinical translation. *Regen Med* 8: 49-64.
- Ito H (2011) Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Mod Rheumatol* 21: 113-121.
- Shinohara K, Greenfield S, Pan H, Vasanji A, Kumagai K, et al. (2011) Stromal Cell-Derived Factor-1 and Monocyte Chemoattractant Protein-3 Improve Recruitment of Osteogenic Cells into Sites of Musculoskeletal Repair. *J Orthop Res* 29: 1064-1069.
- Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB, McGonagle D, Jones E, et al. (2013) Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. *Bone* 57: 484-492.
- Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, et al. (2004) Fibroblast growth factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 636-641.
- Jones E, English A, Churchman SM, Kouroupis D, Boxall SA, et al. (2010) Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis Rheum* 62: 1944-1954.
- Min B-H, Choi WH, Lee YS, Park SR, Choi BH, et al. (2013) Effect of Different Bone Marrow Stimulation Techniques (BSTs) on MSCs Mobilization. *J Orthop Res* 31: 1814-1819.
- Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J (2013) The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 1824-1833.



24. Jones EA, Crawford A, English A, Henshaw K, Mundy J, et al. (2008) Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum* 58: 1731-1740.
25. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues - Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52: 2521-2529.
26. Sharma B, Fermanian S, Gibson M, Unterman S, Herzka DA, et al. (2013) Human Cartilage Repair with a Photoreactive Adhesive-Hydrogel Composite. *Sci Transl Med* 5: 167ra6.
27. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP (2003) Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48: 3464-3474.
28. Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin JY, Boehnlein E, Pastor G, et al. (2002) Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 23: 109-119.
29. Endres M, Neumann K, Haeupl T, Erggelet C, Ringe J, et al. (2007) Synovial fluid recruits human mesenchymal progenitors from subchondral spongy bone marrow. *J Orthop Res* 25: 1299-1307.
30. Endres M, Andreas K, Kalwitz G, Freymann U, Neumann K, et al. (2010) Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 1458-1466.
31. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, et al. (2013) Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg* 40: 530-535.
32. Caplan AI, Correa D (2011) PDGF in Bone Formation and Regeneration: New Insights into a Novel Mechanism Involving MSCs. *J Orthop Res* 29: 1795-1803.
33. Gronthos S, Simmons PJ (1995) The Growth-Factor Requirements Of Stro-1-Positive Human Bone-Marrow Stromal Precursors Under Serum-Deprived Conditions In-Vitro. *Blood* 85: 929-940.
34. Lee CH, Cook JL, Mendelson A, Moiola EK, Yao H, et al. (2010) Regeneration of the articular surface of the rabbit synovial joint by cell homing: a proof of concept study. *Lancet* 376: 440-448.
35. Mendelson A, Frank E, Allred C, Jones E, Chen M, et al. (2011) Chondrogenesis by chemotactic homing of synovium, bone marrow, and adipose stem cells in vitro. *FASEB J* 25: 3496-3504.
36. Mendelson A, Cheung YK, Paluch K, Chen M, Kong K, et al. (2013) Competitive stem cell recruitment by multiple cytotoxic cues. *Lab Chip* 13: 1156-1164.
37. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, et al. (2006) Human Bone Marrow Stromal Cells Express a Distinct Set of Biologically Functional Chemokine Receptors. *Stem Cells* 24: 1030-1041.
38. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, et al. (2007) Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem* 101: 135-146.
39. Stich S, Loch A, Leinhardt I, Neumann K, Kaps C, et al. (2008) Human periosteum-derived progenitor cells express distinct chemokine receptors and migrate upon stimulation with CCL2, CCL25, CXCL8, CXCL12, and CXCL13. *Eur J Cell Biol* 87: 365-376.
40. Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil N, Barone F, Mitsiadis T, et al. (2006) Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther* 8: R139.
41. Richter W (2009) Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med* 266: 390-405.

**Citation:** Jones E, Sanjurjo-Rodriguez C (2014) Stem Cell Therapy for Bone and Cartilage Defects – Can Culture-expansion be Avoided? J Stem Cell Res Ther 4: e118. doi:[10.4172/2157-7633.1000e118](https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000e118)

### Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

#### Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

#### Special features:

- 300 Open Access Journals
- 25,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submission>





